Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudio de las vías de señalización de CD31 y PD-1 en la regulación de la respuesta inmune contra Mycobacterium tuberculosis

Jurado, Javier Oscar

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Jurado, Javier Oscar. (2010). Estudio de las vías de señalización de CD31 y PD-1 en la regulación de la respuesta inmune contra Mycobacterium tuberculosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Jurado, Javier Oscar. "Estudio de las vías de señalización de CD31 y PD-1 en la regulación de la respuesta inmune contra Mycobacterium tuberculosis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Departamento de Química Biológica.

Estudio de las vías de señalización de CD31 y PD-1 en la regulación de la respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis.*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica.

Javier Oscar Jurado

Director de tesis: Dra. Verónica E. García.

Consejero de estudios: Dr. Ernesto Massouh, Dra. Verónica E. García.

Lugar de Trabajo: Depto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2010.

Estudio de las vías de señalización de CD31 y PD-1 en la regulación de la respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis.*

La respuesta de citoquinas Th1 es crítica en la inmunidad contra *Mycobacterium tuberculosis*. Por ello, es crucial comprender el establecimiento y mantenimiento de las respuestas efectoras de los linfocitos T. En este trabajo de tesis, se investigó el rol de proteínas de señalización en la modulación de respuestas de citoquinas y citotóxicas de los linfocitos T durante la infección por *M. tuberculosis*. Los resultados obtenidos demostraron que la interacción entre las proteínas inhibitorias CD31 y SAP participa en la regulación de las vías que conducen a la producción de IFN-γ durante la tuberculosis pulmonar activa. Más aún, en individuos con una fuerte Inmunidad mediada por células contra el patógeno, la estimulación específica con el antígeno induce en las células productoras de IFN-γ el fenotipo $CD31^{-}SLAM^{+}$. Asimismo, se demostró el rol inhibitorio de la vía PD-1:PD-Ls sobre las funciones efectoras de las células Th1 en la tuberculosis. Además, se comprobó que la vía de PD-1:PD-Ls inhibe la expansión de las poblaciones Th1 y Th17 durante la infección por *M. tuberculosis*. Por lo tanto, se concluye que PD-1 modularía la activación y la expansión de las células Th1 y Th17, impidiendo la exacerbación de cada una de estas respuestas. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el uso de anticuerpos bloqueantes y agonistas podría tener importantes implicancias en potenciales terapias para combatir infecciones bacterianas crónicas como la tuberculosis.

Palabras Claves: *M. tuberculosis*, co-estimulación, CD31, SAP, SLAM, PD-1, Th1, IFN-γ, Th17, IL-17.

Study of CD31 and PD-1 signaling pathways in the regulation of the immune response against *Mycobacterium tuberculosis.*

The cytokine Th1 response is crucial in the immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. For that reason, its critical to understand the establishment and maintenance of T lymphocyte effector functions. In this work, the role of signaling proteins on the modulation of cytokine and cytotoxic responses of T lymphocytes during *M. tuberculosis* infection was investigated. The results demonstrated that the interaction of the inhibitory proteins CD31and γ SAP participates in the regulation of the pathways that lead to IFN-γ production during active pulmonary tuberculosis. Moreover, in individuals with strong cell-mediated immunity against the pathogen, specific antigen stimulation induces the $CD31^{-}SLAM^{+}$ phenotype in IFN-γ producing cells. Furthermore, we demonstrated the inhibitory role of the PD-1:PD-Ls pathway on Th1 effector functions in pulmonary tuberculosis. Besides, we showed that the PD-1:PD-Ls pathway inhibits the expansion of the Th1 and Th17 subsets during *M. tuberculosis* infection. Thus, we conclude that PD-1 would modulate the activation and expansion of Th1 and Th17 cells, avoiding exacerbation of each of these responses. Together, the results of this work demonstrate that the use of blocking and agonistic antibodies might have significant implications in potential therapies to fight chronic bacterial infections like tuberculosis.

Key words: *M. tuberculosis*, costimulation CD31, SAP, SLAM, PD-1, Th1, IFN-γ, Th17, IL-17.

Agradecimientos.

A Vero, por abrirme las puertas del laboratorio, por mostrarme que la ciencia es un estilo de vida y por sobre todas las cosas por confiar en mi.

A Vir y Bel, por ayudarme y malcriarme (lo reconozco) todos estos años.

A Darío, Romi y Delfi, por acompañarme en este último tiempo.

A todo el grupo, por que creo que además de trabajar la pasamos muy bien y eso no se encuentra en todos lados.

A Chulu y su equipo, por colaborar siempre con nosotros.

A Rosa, porque sin ella ninguno de los proyectos podrían llevarse adelante.

Al departamento de Química Biológica, por ayudarnos desde el primer día.

A mi Familia; mis viejos, la abuela Irma, Ale, Ceci, Tincho, Caro, Nacho, Marcos, Alejandra, Francisco, Vilma y Nora; por que fueron un apoyo incondicional durante este camino y por sobre todo porque lo seguirán siendo.

A mis sobrinos; Abril, Cata y Toto, son la causa de desear un mundo mejor y eso es más que una motivación para hacer ciencia.

Y principalmente a Rocío, porque en todo este tiempo hubo personas que confiaron en mí, me apoyaron, me ayudaron o me motivaron, y vos me diste todo eso y mucho más. Sin vos no estaría hoy acá.

A Rocío

Como resultado del presente trabajo de investigación de Tesis Doctoral se publicaron los siguientes artículos científicos:

1. María F. Quiroga*****, **Javier O. Jurado*,** Virginia Pasquinelli, Nancy Tateosian, Rosa M. Mussella, Liliana Castro Zorrilla, Eduardo Abbate, Andrew C. Issekutz, Peter A. Sieling, Eduardo Chuluyan, and Verónica E. García. *Cross-talk between CD31 and SAP during IFN-γ production against Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2007 Nov 1; 196(9):1369-78. *** Ambos autores contribuyeron en igual proporción en este trabajo.**

2. **Javier O. Jurado,** Ivana B. Alvarez, Virginia Pasquinelli, María F. Quiroga, Gustavo J. Martínez, Eduardo Abbate, Rosa M. Musella, H. Eduardo Chuluyan, Verónica E. García. *PD-1: PD-L1/PD-2 pathway modulates T cell effector functions against M. tuberculosis*. *The Journal of Immunology,* 2008 Julio 1, 181: 116-125.

Publicaciones en otros trabajos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

1. María F. Quiroga, Virginia Pasquinelli, Gustavo J. Martínez, **Javier O. Jurado**, Liliana Castro Zorrilla, Rosa M. Musella, Eduardo Abbate, Peter A. Sieling, and Verónica E. García. *Inducible Costimulator (ICOS): a modulator of IFN-γ production in human tuberculosis*. *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 5965-5974.

2. Virginia Pasquinelli; James C Townsend; **Javier O Jurado**; Ivana B Alvarez; María F Quiroga; Peter F Barnes; Buka Samten; Veronica Garcia. *IFN-γ production during active tuberculosis is regulated by mechanisms that involve IL-17, SLAM and CREB*. *The Journal of Infectious Diseases.* 2009 Marzo 1; 199(5):661-665.

INDICE

INDICE **1**

ABREVIATURAS **6**

INTRODUCCION **9**

Tuberculosis *10*

Patogénesis. 13

Respuesta inmune contra M. tuberculosis. *16*

Respuesta Inmune Innata. 16

Respuesta inmune adaptativa. 22

Moléculas Co-estimulatorias y Proteínas de Señalización. *30*

Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAM) y Proteína Asociada a SLAM (SAP). 34

Molécula de adhesión celular de endotelio de plaquetas 1 (PECAM-1) o CD31. 42

Receptor de muerte programada 1 (PD-1). 48

OBJETIVOS **54**

MATERIALES Y METODOS **58**

Individuos participantes. *59*

Antígeno. *60*

Cultivos celulares. *60*

Ensayos de Proliferación. *61*

ELISA. *62*

Citometría de Flujo. *62*

Detección de IFN-γ e IL-17 intracelular. *63*

Western blot. *64*

Inmunoprecipitación. *65*

Purificación de células T CD31$^+$ y CD31$^-$. 66

Degranulación lítica. 66

Análisis estadístico. 67

RESULTADOS **68**

La asociación entre CD31 y SAP regula la producción de IFN-γ durante la infección con M. tuberculosis 69

Expresión de CD31 en pacientes con tuberculosis y en dadores sanos. 69

Efecto de la señalización de CD31 sobre la producción de citoquinas durante la estimulación con M. tuberculosis. 70

Regulación del IFN-γ por los linfocitos T CD31$^+$. 72

Papel de CD31 en la modulación de la expresión y función de SLAM en tuberculosis. 73

Interacción de CD31 con SAP, una molécula de señalización que modula la producción de IFN-γ contra M. tuberculosis. 75

Efecto de la señalización de CD31 sobre la producción de IFN-γ luego de la estimulación con M. tuberculosis. 78

Rol de CD31 en los individuos con el gen defectuoso de SAP (pacientes XLP). 79

Función de la vía de PD-1:PD-Ls sobre la regulación de las funciones efectoras de linfocitos T durante la tuberculosis. 81

M. tuberculosis induce la expresión de PD-1 en la superficie de las células T. 81

La expresión de PD-1 se encuentra asociada a la producción de IFN-γ inducida por M. tuberculosis. 82

M. tuberculosis induce la expresión de PD-1 en los linfocitos T del sitio de infección. 85

La activación antigénica de las células T de pacientes con tuberculosis induce la expresión de los ligandos de PD-1. 87

La interacción PD-1:PD-Ls regula las funciones efectoras de las células T en tuberculosis. 89

Aumento de la producción de IFN-γ por el efecto simultaneo de PD-1 y SLAM luego de la estimulación con M.tb. 94

Regulación de las células Th17 a través de la vía de PD-1 en pacientes con tuberculosis. *97*

M. tuberculosis induce la producción de IFN-γ e IL-17 en pacientes con enfermedad activa. *97*

M. tuberculosis induce la secreción de IL-17 por linfocitos Th17. 98

Co-expresión de PD-1 e IL-17 en las células Th17 en pacientes con tuberculosis. 100

Rol de la vía de PD-1 sobre la producción de IL-17 en las células Th17. 102

Efecto del IFN-γ sobre los linfocitos Th17 durante la tuberculosis activa. 104

DISCUSION 107

La asociación entre CD31 y SAP regula la producción de IFN-γ durante la infección con M. tuberculosis. *108*

Función de la vía de PD-1:PD-Ls sobre la regulación de funciones efectoras de linfocitos T durante la tuberculosis. *113*

Regulación de las células Th17 a través de la vía de PD-1 en pacientes con tuberculosis. *121*

CONCLUSION 125

REFERENCIAS 127

ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCR	Receptor de la célula B
CD	Células Dendríticas
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CMFP	Células mononucleares de fluidos pleurales
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTLA-4	Proteína asociada a linfocitos T citotóxicos
IFM	Intensidad de florescencia media
IFN-γ	Interferón gamma
IMC	Inmunidad mediada por células
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ITAM	Inmunoreceptor con motivo activador basado en tirosina
ITIM	Inmunoreceptor con motivo inhibidor basado en tirosina
ITSM	Inmunoreceptor con motivo “switch” basado en tirosina
ICOS	Coestimulador Inducible
M.tb	Antígeno de Mycobacterium tuberculosis
NK	Células natural killer
NF-AT	Factor nuclear de células T activada
NF-κB	Factor nuclear kappa-B
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PD-L1	Ligando 1 de PD-1
PD-L2	Ligando 2 de PD-1
PD-Ls	PD-L1 y PD-L2 (ligandos de PD-1)

PECAM-1	Molécula de adhesión celular de endotelio de plaquetas 1 o CD31
PPD	Derivado Proteico Purificado
SLAM	Molécula Linfocitaria Activadora de Señales
SAP	Proteína Asociada a SLAM
Stat	Proteínas transductoras de señales y activadora de la transcripción
T-bet	T-box expresado en células T
TCR	Receptor de la célula T
Th	Linfocito T colaborador (“helper”)
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Células T regulatorias
XLP	Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

INTRODUCCION

Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad crónica causada por la bacteria intracelular *Mycobacterium tuberculosis,* un patógeno altamente exitoso. A pesar de contar con más de 100 años de investigación, la tuberculosis sigue siendo la infección bacteriana más importante del mundo. Los últimos reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaron entre 8 y 10 millones de nuevos casos para el año 2008 y 1.5 millones de personas que murieron a causa de este patógeno (1). La mayoría de las muertes asociadas a tuberculosis ocurren en países de medianos y bajos recursos, donde existen limitaciones significativas en los recursos para el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad. Los últimos datos de la OMS revelaron que el 80% de los casos reportados de tuberculosis en el mundo se concentraba en África, Sudeste Asiático y Oeste del Pacífico. Además, la incidencia anual de tuberculosis en Europa fue de 49 casos cada 100.000 habitantes, en Estados Unidos 5/100.000 y en África 363/100.000. Estas estadísticas variaron considerablemente entre los países de las mismas regiones, donde la mayor tasa se observó en Suazilandia (África) con 1.150/100.000 y la menor en Mónaco (Europa) con 2/100.000 (1) (Figura 1). Estos datos se correlacionan con las desventajas sociales y económicas de las regiones afectadas. En Argentina los últimos reportes notificaron 11.900 nuevos casos de tuberculosis en el 2008, con casi 700 muertes anuales (1).

Alteraciones en el sistema inmune, tales como las ocasionadas por el HIV, desnutrición, diabetes, etc.; aumentan considerablemente la tasa de desarrollo de la enfermedad. En particular, la interacción tuberculosis-HIV

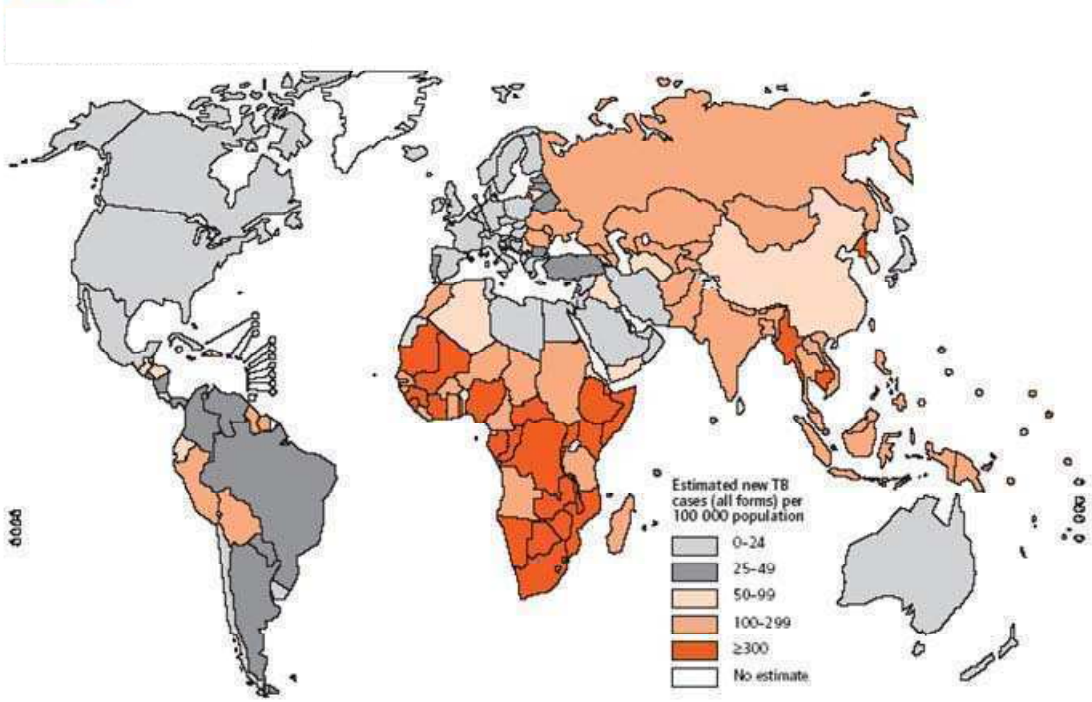

Figura 1. Incidencia de nuevos casos de tuberculosis en el 2008. (Adaptado de *WHO, A short update to the 2009 report*)

está ocasionando efectos devastadores (2, 3): la infección por HIV ha emergido como el principal factor predisponente para el desarrollo de tuberculosis (primaria o reactivación), la co-infección HIV-*M. tuberculosis* constituye una combinación letal, ya que cada una de estas infecciones individualmente acelera el progreso de la otra, siendo la infección por este patógeno intracelular una de las principales causas de muerte en individuos HIV positivos. A este respecto, por un lado, la tuberculosis empeora el estado de la infección por el virus, incrementando la replicación viral, disminuyendo la inmunidad y acelerando el inicio del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (4), y por el otro, la co-infección por el HIV incrementa marcadamente el riesgo de progresión a tuberculosis activa, ya que la habilidad del huésped de controlar la infección bacteriana se encuentra limitada (5).

La única vacuna contra la tuberculosis es la BCG (*M. bovis* Bacillus Calmette-Guerin). Si bien muestra eficiencia en la prevención de formas severas de tuberculosis infantil, ha sido demostrado que provee una escasa protección contra las formas más frecuentes de tuberculosis, especialmente la tuberculosis pulmonar en adultos (6). Como consecuencia, a pesar del uso de la vacuna BCG en ciertos países como la Argentina, la tuberculosis continúa siendo una epidemia global, por lo que el diseño de una nueva vacuna efectiva constituye una necesidad urgente. Más aún, nuevas estrategias experimentales han mostrado ser prometedoras (6), pero el desarrollo de una vacuna eficiente contra la tuberculosis claramente depende de una completa comprensión de la respuesta inmune del huésped frente a la infección por este patógeno (7). A esto se agrega el significativo problema clínico constituido por la tuberculosis multiresistente, lo cual se asocia con alta morbilidad y mortalidad.

Un tercio de la población mundial está latentemente infectada con *M. tuberculosis*. Luego de la infección, se establece un balance entre el huésped y el patógeno, y el tipo de respuesta inmune montada contra la bacteria influenciará fuertemente el curso de la enfermedad (7). Aproximadamente en un 5% de los individuos inmunocompetentes, la infección progresa de la forma latente a la enfermedad activa en el transcurso de dos años; en otro 5%, la reactivación de la enfermedad ocurre más tarde (7). La razón de la progresión a la enfermedad no ha sido aún completamente definida. Por otro lado, aproximadamente el 90% de los individuos inmunocompetentes con tuberculosis latente permanecen como individuos sanos, sin síntomas, a lo largo de toda su vida. Estos individuos

desarrollan una fuerte respuesta inmune, pero el bacilo permanece indefinidamente en el huésped.

Si bien las manifestaciones de la enfermedad que esta bacteria produce usualmente se observan en el pulmón, la tuberculosis puede no obstante afectar cualquier órgano del cuerpo humano tales como los ganglios linfáticos, el cerebro y los huesos, así como las estructuras adyacentes al pulmón, como el espacio pleural. El derrame pleural tuberculoso o pleuresía tuberculosa es una de las formas más comunes de tuberculosis extrapulmonar. La principal causa del derrame pleural es una respuesta de hipersensibilidad retardada a los antígenos de micobacterias en el espacio pleural aunque tambien se observo que podría desarrollarse como una complicación de la tuberculosis pulmonar primaria.

Patogénesis.

En la patogénesis de la tuberculosis es posible distinguir tres etapas, durante las cuales intervienen múltiples factores, como factores de virulencia propios del microorganismo y una respuesta inmune inapropiada del huésped que conduce a daño tisular (8).

La primera etapa se inicia con la inhalación de partículas con *M. tuberculosis*, y este contacto fértil con el bacilo conduce a evolución de la infección primaria hacia enfermedad. Sin embargo, sólo 10 % del inóculo inhalado llega a los alvéolos y bronquiolos, donde la bacteria es reconocida y fagocitada por los macrófagos alveolares o las células dendríticas (CD) (8). Una vez dentro de las células, el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* dependerá de la capacidad de evasión de la bacteria y de los mecanismos microbicidas de los macrófagos. Los macrófagos expuestos a

M. tuberculosis secretan citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF-α e IL-6) que contribuirán a la formación de lesiones focales granulomatosas, proceso que lleva 2-3 semanas, y que generalmente conduce a la contención del patógeno (9).

La segunda etapa comienza a las 3 semanas, desarrollándose una respuesta antígeno específica que contribuye a resolver la infección en un huésped inmunocompetente. Estos individuos permanecerán infectados y serán portadores del bacilo, pero no presentarán signos de infección (individuos con tuberculosis latente). Los macrófagos infectados, presentes en el interior del granuloma, serán eliminados; en tanto que a nivel periférico se producirá fibrosis (8). Luego de 4-5 semanas de infección progresiva, los granulomas microscópicos aumentan de tamaño y se fusionan con otros granulomas, ocasionando grandes áreas necróticas rodeadas por capas de histiocitos epiteloides, células gigantes multinucleadas, fibroblastos, linfocitos y monocitos. A pesar del pH ácido, la baja concentración de oxígeno y la presencia de ácidos grasos tóxicos, *M. tuberculosis* puede permanecer viable por décadas. La infección puede mantenerse en esta etapa o progresar hacia la siguiente etapa, según la inmunidad mediada por células. Si la misma es apropiada, el granuloma se resolverá, dejando pequeñas lesiones fibrosas calcificadas (8).

La tercera y última etapa se produce por reactivación del bacilo latente, comenzando una infección aguda secundaria; si bien la infección secundaria también puede ocurrir por inhalación adicional de *M. tuberculosis*. Actualmente se desconoce el mecanismo responsable de la reactivación, pero está claramente asociado a factores del sistema inmune del huésped, ya que condiciones que afectan al mismo (infección por HIV,

terapia con esteroides, edad avanzada, desnutrición), favorecen el proceso de reactivación. En estos casos, los macrófagos infectados pueden escapar del granuloma ocasionando diseminación hacia el ganglio linfático regional. Si la inmunidad mediada por células es inadecuada, la respuesta de hipersensibilidad retardada tratará de combatir a los bacilos que se multiplican, pero a la vez ocasionará destrucción del tejido pulmonar llevando a la formación de cavidades. La reactivación que progresa a formación de cavidades, con multiplicación extracelular en altísimos números de la bacteria, favorece la propagación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes y de alta virulencia (8) (Figura 2).

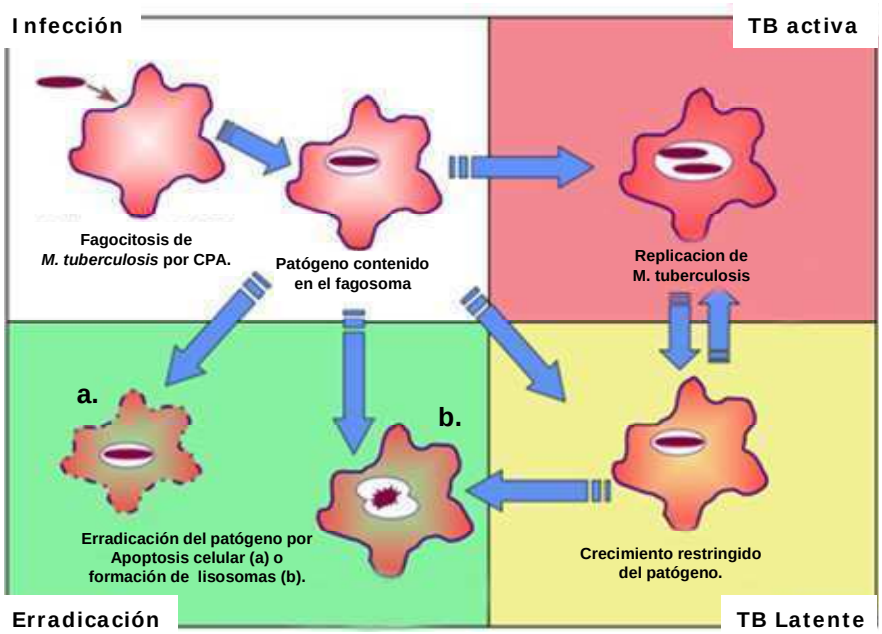

Figura 2. T*uberculosis: de la infección a la enfermedad activa.* Existen tres etapas o resoluciones diferentes en la infección humana por *M. tuberculosis*. La frecuencia de la cura espontánea es desconocida, pero se supone que es poco frecuente. En el huésped inmuncomprometido, la infección puede desarrollarse directamente luego de la infección. En la mayoría de los casos, las micobacterias son inicialmente contenidas y la enfermedad se desarrolla luego como resultado de la reactivación.
(Adaptado de APMIS 117(5-6):440-57).

Respuesta inmune contra M. tuberculosis.

Respuesta Inmune Innata.

La respuesta inmune innata está compuesta por varios tipos celulares, tiene su propio sistema de receptores para reconocer la presencia de agentes patógenos, y es clave en el inicio de la respuesta inmune del huésped. No es de extrañar que diferentes patógenos exitosos hallan desarrollado formas de evadir la repuesta inmune innata con el fin de encontrar un nicho en el hospedador. Como ya mencionamos, la tuberculosis comienza con la inhalación de aerosoles que contienen a la bacteria. En los alvéolos pulmonares las bacterias se unen a receptores involucrados en la fagocitosis e ingresan en los macrófagos alveolares residentes, las células dendríticas (CD) y los monocitos reclutados en el torrente sanguíneo.

Los macrófagos alveolares residentes son el primer tipo celular involucrado en la fagocitosis de *M. tuberculosis* (10). Luego de este primer encuentro, las CD y los macrófagos derivados de monocitos también forman parte del proceso fagocítico. Un gran número de receptores son críticos en el reconocimiento del patógeno. Estudios in vitro han implicado al receptor del complemento CR3 como un receptor importante de los macrófagos para la fagocitosis de la bacteria (11). Sin embargo, varios otros receptores de la superficie de los macrófagos, tales como CR1, CR4, receptor de manosa, CD14, la proteína surfactante A (SP-A) y los receptores Scavenger también pueden reconocer y unirse a este patógeno in vitro (12-14). Además de la expresión del receptor CR3 y el receptor de manosa, las CD espresan otros

receptores adicionales para la fagocítosis de *M. tuberculosis,* como la lectina tipo C y DC-SIGN (15).

M. tuberculosis además es reconocido por receptores tipo Toll (TLR). Los TLRs son esenciales para el reconocimiento de componentes microbianos por parte de macrófagos y CD, y la activación de estos receptores en la respuesta inmune innata permitirá la subsiguiente activación de la respuesta inmune adaptativa frente a distintos patógenos (10, 16). Varios estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que los TLRs son reguladores críticos de la respuesta inmune en tuberculosis. Estudios *in vitro* indican que *M. tuberculosis* es reconocido por el TLR2/1/6, TLR9, y posiblemente también por TLR4 (17, 18). Ha sido propuesto que el TLR2 tiene un rol central en el reconocimiento de *M. tuberculosis* por los macrófagos (15). La pared celular de las micobacterias contiene un gran número de ligandos proinflamatorios del TLR2, incluyendo lipoproteínas, peptidoglicanos complejos, lípidos, y lipoarabinomananos (LAM) (15). Los LAM de *M. tuberculosis* poseen una terminación de manosa no estimulatoria (ManLAM), la cual está ausente en las micobacterias de crecimiento rápido (ara-LAM). Ha sido demostrado que ara-LAM pero no Man-LAM es un ligando del TLR2 (15). Trabajos recientes sugieren que el TLR1, TLR6 y TLR9 cooperarían con el TLR2 para el reconocimiento de la micobacteria por macrófagos y CD (15) (Figura 3).

Aunque el IFN-γ es sin duda necesario en la respuesta contra la infección por *M. tuberculosis* (19), existen vías anti-micobacterianas que son independientes de esta citoquina y que son inducidas en los macrófagos por los TLRs. Ha sido demostrado que la activación de los macrófagos a través del TLR2 aumenta la expresión de los genes del receptor de la

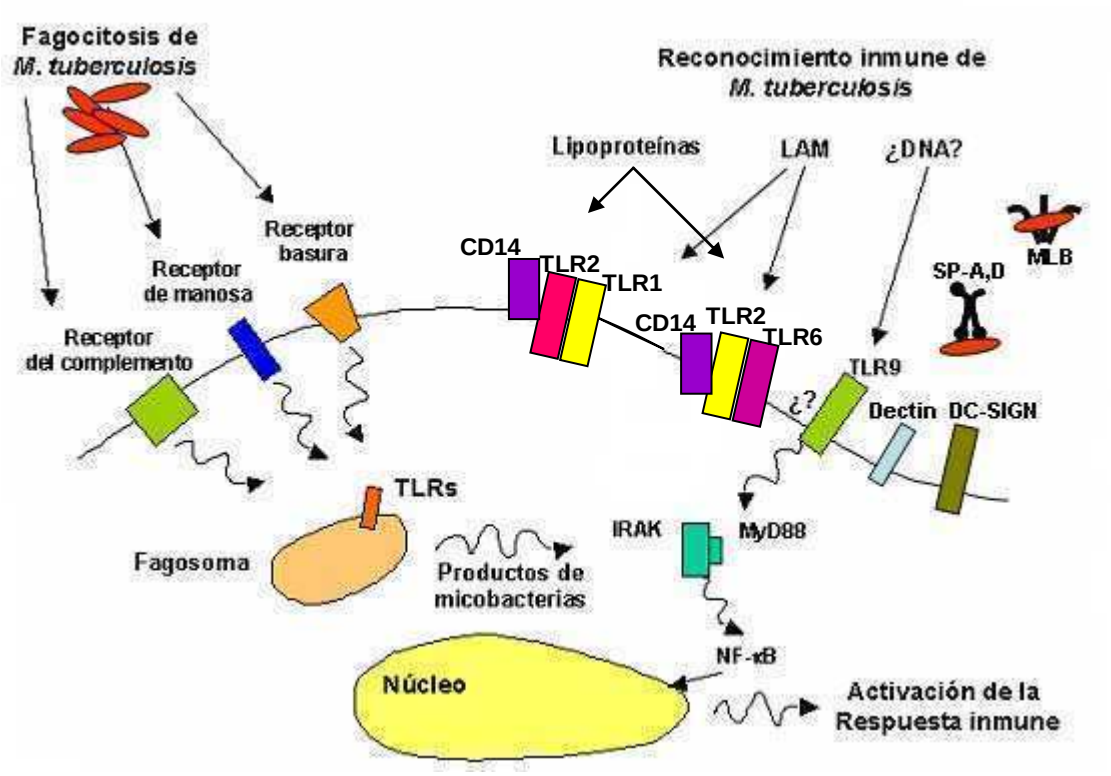

Figura 3. ***Fagocitosis y reconocimiento inmune de M. tuberculosis.*** Varios receptores han sido identificados para el reconocimiento de *M. tuberculosis* por macrófagos y CD (ver texto para más detalle). Luego de la unión a los TLR, vías de señalización comunes son activadas que llevan a la activación celular y la producción de citoquinas. Los TLR se expresan no solo en la superficie celular sino también en los fagosomas, por lo tanto la activación inmune puede ocurrir en presencia o ausencia de fagocitosis. Por otro lado, la fagocitosis sola, probablemente no lleva a la activación inmune sin la acción de los TLR. Sp-: receptor de las proteína surfactantes, MBL: lectinas de unión a manosa, LAM: lipoarabinomananos.
(Adaptado de *Clin Microbiol Rev 15:294*)

vitamina D y de la vitamina-D1-hidroxilasa, dando lugar a la inducción de péptidos antimicrobianos como catelicidina (20). Más aún, la activación de la vía de la vitamina D3 controla la replicación de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos (21) y la deficiencia de esta vitamina es un factor de riesgo para la tuberculosis (22). Otros mecanismos de muerte inducidos por los TLRs pueden participar en la respuesta inmune innata frente a *M. tuberculosis*. Por ejemplo, CPG, un activador de la vía de TLR9, también induce una rápida respuesta anti-micobacteriana en los macrófagos de una manera dependiente de la fosfolipasa D (23).

Una importante consecuencia de la interacción de *M. tuberculosis* con los TLRs en los macrófagos y en las CD es el estallido de la secreción de citoquinas y quemoquinas. La inducción de estas moléculas efectoras regula la formación del granuloma e inicia y da forma a la posterior respuesta inmune adaptativa. Claramente la inducción de la inmunidad celular Th1 es esencial para la protección contra *M. tuberculosis*, como se evidencia en pacientes co-infectados con HIV (24) y en individuos que presentan genes defectuosos para IFNγR e IL-12R (25) los cuales son extremadamente susceptibles a patógenos intracelulares, incluyendo micobacterias. Las citoquinas y quemoquinas reclutan células inflamatorias (células T, neutrófilos, y células NK) al área de infección y coordinan la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* (15). Esta respuesta es regulada por una red compleja de citoquinas proinflamatorias, anti-inflamatorias y quemoquinas. La mayoría de los mediadores en este punto (IL-1β, IL-12, IL-23, TNF-α, IL-15, IL-18, entre otros) son producidos por macrófagos o CD (10).

IL-12 es una de las principales citoquinas que dirigen la diferenciación de las células T naive hacia el fenotipo Th1 y a la secreción de IFN-γ (citoquina efectora de las respuesta Th1 por excelencia) (26), pero su acción no sólo se limita a la inducción de esta repuesta. Reportes recientes indican que IL-12 participaría tanto en la inducción como en el mantenimiento de la inmunidad Th1, por eso es necesaria la producción sostenida de esta citoquina durante todo el curso de la infección. Interesantemente, en las CD, *M. tuberculosis* estimula la producción de IL-12, (7) que activa a células NK y células T, induciendo la secreción de más IFN-γ y creando así un sistema de retroalimentación positivo que favorece

la polarización de linfocitos T precursores a linfocitos Th1 (27). Aunque las células NK y las células T han sido consideradas por mucho tiempo como las fuentes exclusivas de IFN-γ, publicaciones más recientes han demostrado que esta citoquina Th1 podría también ser producida por monocitos, macrófagos y CPA (28, 29). Más aún, ha sido demostrado que las CD humanas de individuos sanos producen IFN-γ en respuesta a la estimulación con BCG por un mecanismo dependiente de TLR2 (30).

El TNF-α juega un rol importante en la regulación de la patología de la tuberculosis (31) y su secreción es mediada por macrófagos, CD y células T (32). Esta citoquinas en conjunto con el IFN-γ estimulan la producción de la sintetasa inducible de oxido nítrico (NOS-2), responsable de los altos niveles de oxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno que poseen funciones bactericidas frente a *M. tuberculosis* en ratón (33). Otra propiedad de el TNF-α es inducir la apoptosis de los macrófagos alveolares infectados con *M. tuberculosis* (34), y así contribuir indirectamente a la reducción de la carga bacteriana. Además, el TNF-α dispara la expresión en macrófagos de un gran número de quemoquinas (35), que atraen a las células al sitio de infección y son importantes en la formación y mantenimiento del granuloma. Algunas de las principales quemoquinas liberadas por los macrófagos incluyen a CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10, y CXCL13 (36). Además, las CD infectadas también secretan quemoquinas como CXCL9, CXCL10, CCL3, y CCL4 colaborando en el reclutamiento de células al pulmón (37). En un modelo de tuberculosis en ratón, se ha demostrado que el primer paso, específicamente el reclutamiento de CD inmaduras y monocitos al sitio de infección, sería mediado por CCR2 (38). Sin embargo, ratones deficientes en CCL2/MCP-1, un ligando para CCR2, no

mostraron menor susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis*, lo que indicaría que *in vivo* otras quemoquinas como CCL7, CCL8 y CCL12 podrían compensar la falta de CCL2/MCP-1 (39).

Luego de las fagocitosis de *M. tuberculosis* por las CD inmaduras y su posterior activación a través de los TLR (40) el siguiente paso en el desarrollo de la inmunidad del huésped es el transporte de agentes patógenos de los pulmones a los ganglios linfáticos de drenaje, donde las CD maduras pueden presentar antígenos a las células T naive e iniciar el proceso de la respuesta inmune adaptativa (41). La migración de las CD parece estar regulada en cierta medida por homodímeros de IL-12p40 (42). Dado que la maduración y migración de las CD es un paso clave en la vinculación de la inmunidad innata y adaptativa, no es sorprendente que *M. tuberculosis* interfiera negativamente en este proceso. IL-10 impide la migración de las CDpor un mecanismo que podría involucrar la disminución de IL-12p40 (43). La liberación IL-1β por CPA infectadas con micabacterias inhibe la maduración de las CD (44). Asimismo, se ha demostrado que una cepa virulenta de *M. tuberculosis* altera la maduración de las CD derivadas de monocitos (45).

Además de los macrófagos y CD las células Tγδ, células T restringidas a CD1 y células NK también participan en la respuesta inmune innata contra la tuberculosis (7). Estudios recientes han demostrado que la inducción de células Tγδ en la respuesta inmune contra la tuberculosis precede a la de las células CD4 y CD8 convencionales y por lo tanto desempeña un papel importante en la modulación de la respuesta efectora contra la tuberculosis (46). Una vez activadas, las células Tγδ secretan IFN-γ y TNF-α. La producción de estas citoquinas fortalece la capacidad bactericida de los

macrófagos en la inducción de NOS-2 (46). En ratones deficientes en células Tγδ infectados con *M. tuberculosis* se observó una mayor migración de neutrófilos y un aumento del tamaño del granuloma, lo que indicaría un importante rol de las células Tγδ en la formación de granulomas y en la contención de la micobacteria (47). Por otro lado, las células T con receptores CD1 que reconocen lípidos y glicolípidos también participan en la generación de una respuesta inmune protectiva contra *M. tuberculosis* principalmente secretando IFN-γ (7). Otro tipo celular reclutado al pulmón durante la infección temprana por *M. tuberculosis* son las células NK, fuente primaria de IFN-γ. Más aún, luego de su activación a través de los TLRs las células NK inducen la lisis de los macrófagos infectados (48).

En resumen, esta respuesta inicial determina el crecimiento local de *M. tuberculosis* o la contención de la infección. Las células fagocíticas poseen un rol clave en el inicio de la respuesta local inflamatoria, así como también en la presentación antigénica y la iniciación de la inmunidad mediada por células.

Respuesta inmune adaptativa.

La mayoría de las funciones de las ramas humoral y celular del sistema inmune adaptativo son llevadas a cabo por células T helper (Th). Estas funciones son facilitadas por la habilidad de estas células para diferenciarse luego de su activación en las subpoblaciones Th1 y Th2, favoreciendo así la inducción de funciones inmunes celulares y humorales, respectivamente, y permitiendo de esta manera al organismo responder a microorganismos intracelulares y extracelulares (49). Las células

diferenciadas hacia un fenotipo Th1 secretarán IL-2, IFN-γ y TNF-α mientras que las células Th2 producirán IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (50). El proceso de diferenciación a linfocito Th1 o Th2 puede ser influenciado por la concentración y vía de administración del antígeno, el tiempo de interacción entre el receptor de las célula T (TCR) y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH)-péptido, el tipo de CPA que estimula a la célula T y moléculas co-estimulatorias presentes en las membranas celulares tanto de las CPA como de los linfocitos T, aunque los reguladores más potentes de la diferenciación Th son indudablemente las citoquinas.

La inmunidad contra micobacterias consiste en una compleja serie de interacciones entre varias poblaciones celulares que deben controlar y contener la infección, así como prevenir la reactivación de la misma. La inmunidad celular contra el patógeno involucra una crítica interrelación entre linfocitos T, células presentadoras de antígeno (macrófagos y CD) y mediadores solubles (citoquinas y quemoquinas). La respuesta inmune protectiva en tuberculosis puede ser definida como una respuesta Th1 ya que la inmunidad celular y la producción de IFN-γ por células T $CD4^+$ y $CD8^+$ es crítica para el control de la enfermedad (33, 51, 52). Los eventos relacionados con la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped frente a la micobacteria empiezan con el arribo de *M. tuberculosis* al pulmón; por lo tanto una interacción coordinada entre la respuesta innata y la adaptativa es esencial. Como se mencionó anteriormente, una vez que las CD alcanzan los ganglios linfáticos, se inicia la activación de las células T naive. El desarrollo y la función de todas las células efectoras dependerán de la capacidad de las CD para promover la supervivencia de estas células de manera eficiente. De esta manera, cuando las células T se encuentran

por primera vez en la periferia con el antígeno presentado por las CPA, se inicia un proceso de diferenciación celular que incluye el compromiso de las células T hacia la producción de un patrón de citoquinas específico (49).

Dado que *M. tuberculosis* reside en vacuolas intra-citoplasmáticas, los antígenos son presentados a las células T principalmente en el contexto de CMH II. Consecuentemente, las células T $CD4^+$ son de importancia crítica en el control de la infección, como ya ha sido demostrado exhaustivamente en modelos animales deficientes en células T $CD4^+$ (7). En humanos, el ejemplo más dramático está representado por los individuos HIV^+ infectados con *M. tuberculosis* en forma latente. Estos pacientes tienen un riego anual del 8-10% de desarrollar tuberculosis activa, comparado con un 10% de riesgo a lo largo de toda la vida en individuos HIV negativos PPD^+ (7, 51). Los linfocitos T CD4 no sólo cumplen la función de secretar citoquinas como el IFN-γ, nuevas evidencias sugieren que podrían tener funciones citotóxicas, particularmente en la respuesta inmunitaria en el pulmón (53, 54). Por otro lado, las células T CD8 (restringidas a CMH I) tienen una importante participación en la fase crónica de la infección. Estas células podrían contribuir a la respuesta inmune frente al bacilo tuberculoso, al menos por tres mecanismos: secreción de IFN-γ, lisis de células infectadas por la interacción Fas/Fas-ligando o por la acción de perforinas y granzimas, y actividad micobactericida directa (55). Aunque, existe una fuerte respuesta humoral durante la tuberculosis, el rol de las células B no está bien definido. Más aún, en individuos con defectos en las vías clásica y alternativas del complemento, la vía de unión a lectinas, o neutropenia no se ha observado incremento de la susceptibilidad a la tuberculosis (56). Por el contrario, las células T son de importancia fundamental en la resistencia

frente a las micobacterias, como se observa en pacientes con enfermedades hereditarias tales como inmunodeficiencias combinadas severas, en los cuales se observa infección por BCG diseminada o fatal, y en pacientes con tratamientos inmunosupresores de la función T que presentan mayores riesgos de enfermedades micobacterianas (56).

Si bien, como ya mencionamos el IFN-γ es la principal citoquina activadora de macrófagos y en conjunto con TNF-α, estimulan la producción de NOS-2, responsable de los altos niveles de oxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno que poseen funciones bactericidas frente a *M. tuberculosis* en ratón (33), el IFN-γ también estimula la expresión de LRG-47, una nueva GTPasa que induce en los macrófagos la eliminación de *M. tuberculosis*, independientemente de NOS-2 (57). Conjuntamente con el IFN-, LRG-47 induce procesos de autofagia en los macrófagos, así estas células vencen el bloqueo de la maduración del fagosoma inducido por la micobacteria e inhiben la supervivencia intracelular de la misma (58). Por lo tanto, aunque el IFN-γ solo no puede controlar la infección por *M. tuberculosis*, es sin lugar a duda necesario para la generación de respuestas protectivas frente a este patógeno. Por último, sin bien esta citoquina podría también inducir inmunopatología; ha sido demostrado que existen mecanismos regulatorios que controlan su propia acción y limitan la respuesta inflamatoria exacerbada (33).

No sólo estas poblaciones de linfocitos actúan durante la respuesta inmune celular frente a *M. tuberculosis*. Como previamente mencionamos las células T restringidas CD1 y las células Tγδ y las celulas NK participan activamente frente a este patógeno (7). La mayoría de los individuos responden inicialmente a la infección por *M. tuberculosis* mediante la

producción de IFN-γ, y ha sido propuesto que estos subtipos de células T no convencionales (59, 60), cuyos receptores son mucho menos variables que la de las células T convencionales limitados por moléculas de CMH I y II, actúan como un puente entre la respuesta innata y la adaptativa (61, 62). Las células Tγδ y las células T restringidas CD1 proliferan considerablemente durante las primeras fases de la infección por *M. tuberculosis* (61, 62). Mediante la secreción de IFN-γ, colaboran con la activación de las CPA, incrementando la expresión de moléculas de CMH y moléculas co-estimulatorias y la producción de IL-12 e IL-18, resultando en un ciclo de retroalimentación positiva para la producción de IFN-γ (63). Por otro lado, estas poblaciones celulares también poseen mecanismos de citotoxicidad dependiente de gránulos similares al de los linfocitos T $CD8^+$ (7).

Durante décadas se ha sugerido la existencia de una subpoblación adicional de células capaces de inducir inflamación tisular y autoinmunidad (64). A lo largo de los últimos años, ha habido una importante evolución que condujo a los inmunólogos a revisar la hipótesis Th1 y a desarrollar un nuevo modelo para explicar la regulación del daño tisular que produce patología en varías condiciones autoinmunes e infecciones microbianas (65). Esta búsqueda llevó a la identificación de las células Th17 productoras de IL-17 (66, 67). Ha sido demostrado que IL-17 es secretada por una amplia gama de tipos celulares (68-73), sin embargo, son las células $TCD4^+$ productoras de IL-17 las que han sido definidas como el linaje Th17 (74). La IL-17 es una citoquina con actividades pleiotrópicas que coordina la inflamación de los tejidos mediante la inducción de citoquinas proinflamatorias (como IL-6 y TNF-α), quemoquinas y metaloproteasas, las

cuales median la infiltración y destrucción tisular (75). Esta citoquina también está involucrada en la proliferación, maduración y quimiotaxis de los neutrófilos (64). Recientemente, fue reportado por primera vez, que las células T $CD4^+$ productoras de IL-17 e IL-22 contribuyen a la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* en personas expuestas al patógeno y en pacientes con tuberculosis (76) y si bien IL-17 es inducida rapidamente en las células Tγδ durante la infección (70), la producción de IL-17 por los linfocitos $TCD4^+$ es requerida para la eliminación de la infección primaria y el establecimiento de una respuesta de memoria efectiva (77). Más aún, ratones deficientes en el receptor de IL-17 resultaron más susceptibles a infecciones pulmonares bacterianas debido al reclutamiento reducido de neutrófilos al pulmón (78). Similarmente, la sobre-expresión de IL-17 en el pulmón indujo la expresión de quemoquinas y la inflamación tisular por leucocitos (79). Por otro lado, ha sido demostrado que la IL-23 es esencial para la generación de la respuesta Th17 frente a la infección por micobacterias (80). IL-23 es también capaz de inducir células Th1 productoras de IFN-γ, en respuesta a *M. tuberculosis*, en ausencia de IL-12p70 (81). Sin embargo, ni la respuesta Th1 ni la protección se pierden en ausencia de IL-23 (81). Contrariamente, cuando se utilizó un adenovirus de IL-23 previo a la infección, éste incrementó la respuesta de IFN-γ e IL-17 en el pulmón, confiriendo una mayor protección (82). Así, estos resultados sugieren que la IL-23 podría tener un rol secundario a IL-12 en la inducción de la respuesta inmune protectiva mediada por IFN-γ (80).

Una de las primeras observaciones sobre el desarrollo de las células Th17 ha sido que la diferenciación de estas células podría ser inhibida por

citoquinas Th1 como IFN-γ (83, 84). Más aún, previamente nuestro grupo de trabajo demostró que la adición de IL-17 a células estimuladas con *M. tuberculosis* inhibe la producción de IFN-γ en pacientes con tuberculosis (85). Sin embargo, un nuevo estudio ha revelado que el IFN-γ sería necesario para condicionar a las CPA a promover el desarrollo de linfocitos Th17 humanos (86). Por otro lado, estudios recientes demostraron que las células Th17 podrían cambiar de fenotipo productor de IL-17 a productor de IFN-γ o co-expresión de ambas citoquinas, durante la respuesta inflamatoria *in vitro* e *in vivo* (87, 88). En correlación, existe amplia evidencia de la existencia de una población $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+IL\text{-}17^+$ que expresa los marcadores propios de las poblaciones Th1 y Th17 (T-bet, RORγT respectivamente) (89-93). En conjunto, estos resultados sugerirían nuevos roles del IFN-γ y de la IL-17 en el control de la inflamación cambiando el dogma de que el IFN-γ suprime a las células Th17 y la IL-17 inhibe a los linfocitos Th1.

Para controlar la tuberculosis es necesario entender los mecanismos que inducen a una respuesta inmune celular que lleve a la remoción eficiente de la bacteria y no resulte en una inflamación exacerbada que podría matar al huésped. Con el creciente interés en las células T reguladoras (Treg), el potencial de las mismas para modular la respuesta inmune en la tuberculosis ha sido objeto de varias investigaciones. Existen cada vez más evidencias que sugieren que las células Treg suprimen la inmunidad frente a *M. tuberculosis* y podrían por lo tanto contribuir a la patogénesis de la tuberculosis humana (94-97). A este respecto, experimentos realizados en nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio del Dr. Peter Barnes demostraron que las CMSP de pacientes

con tuberculosis tienen porcentajes incrementados de Treg (94). Más aún, las células Treg se expanden en respuesta a estimulación con *M. tuberculosis* a través de un mecanismo que depende de ManLAM y de PGE2 (94). Finalmente, ha sido demostrado que la frecuencia de células Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ en los fluidos pleurales correlaciona inversamente con la respuesta local específica contra *M. tuberculosis* (97). Diferentes estudios sugieren que las células Treg afectarían la capacidad de las células T efectoras que median la inmunidad, sin embargo, no está claro cuáles son las consecuencias de la depleción de la actividad regulatoria a largo plazo (98).

Si la respuesta Th1 representa el patrón protectivo necesario para el control de la tuberculosis, principalmente a través de la secreción de IFN-γ, entonces citoquinas como IL-10, TGF-β, IL-4 y otras citoquinas supresoras de respuestas Th1 podrían estar involucradas en la progresión de la enfermedad. El potencial rol de la IL-10 en la regulación de la respuesta celular protectiva contra *M. tuberculosis* ha sido ampliamente estudiado en los últimos años. En humanos, la presencia de polimorfismos específicos de IL-10 está asociada con una mayor suscepitilidad a la infección por *M. tuberculosis* (98, 99). Un ejemplo es la tendencia hacia el desarrollo de la tuberculosis primaria progresiva en los seres humanos que poseen aumentada la producción de IL-10 (99), y en algunos casos, este aumento ha sido correlacionado con una vacunación de BCG ineficiente (100). Además, se ha observado que la IL-10 es capaz de inducir reactivación de la enfermedad en animales (101). En forma similar a la IL-10, el TGF-β1 regula negativamente la producción de IFN-γ y es también un factor inhibitorio de la activación de macrófagos producido en altas cantidades por

los monocitos en pacientes con tuberculosis (102). Finalmente, la IL-4 y otros marcadores de actividad Th2 tales como IgE e IgG4, se encuentran frecuentemente en pacientes con tuberculosis avanzada (103). Sin embargo, algunos estudios en animales no demuestran claramente un dicotomía del patrón Th1-Th2 en la respuesta inmune en tuberculosis (104). Más aún, ratones deficientes en el gen de IL-4 e infectados con *M. tuberculosis* muestran cargas bacterianas similares a los ratones salvajes (105). IL-4 y TNF-α actúan de manera sinérgica, incrementando la patología de la enfermedad y la fibrosis, y esta función parecería ser más importante que los efectos inhibidores de las respuestas Th1 mediados por la IL-4 (106). Aún no ha sido dilucidado entonces, si IL-4 causa o simplemente refleja la actividad de la enfermedad en la tuberculosis humana. Más aún, ha sido sugerido que la falla de la respuesta inmune en tuberculosis podría explicarse por una respuesta Th1 débil o suprimida más que por una fuerte respuesta Th2.

El conocimiento de la respuesta celular en la infección por *M. tuberculosis* ha avanzado en los últimos años. Pero aún no se ha definido el tipo de respuesta celular adquirida que debe ser inducida por la vacunación. Por dicha razón, determinar si cada tipo de respuesta celular específica es protectiva o patológica, así como la mejor manera de inducir a cada una de ellas, resulta de suma importancia para lograr desarrollar nuevas vacunas efectivas contra el patógeno.

Moléculas Co-estimulatorias y Proteínas de Señalización.

La activación de las células T requiere la interacción del TCR con antígeno peptídico al CMH sobre la superficie de la CPA. Esta interacción denominada comúnmente como la “señal 1” no sólo es insuficiente para la activación celular, sino que puede llevar a la célula a la apoptosis o a un estado de anergia (107). Para una óptima activación, la célula T requiere de una segunda señal la cual es provista por la interacción de moléculas co-estimulatorias expresadas sobre la CPA, con sus ligandos específicos localizados sobre las células T (Figura 4). Estas moléculas co-estimulatorias pueden emitir señales positivas o negativas que activan o inhiben la función de la célula T (107, 108). Datos recientes presentan un nuevo desafío a este modelo de dos señales (y dos tipos celulares), ya que revelan que la polarización Th1 requiere de la presencia de IFN-γ provista por un tercer tipo celular (109). La señal “tres” o polarización dirige la diferenciación de las células T hacia varios fenotipos efectores, tales como Th1 y Th2, y es el resultado de la unión de productos microbianos o señales de peligro endógenas con receptores tales como los receptores tipo Toll (TLR) en las CD. Ha sido propuesto que las células NK o células Tγδ, podrían ser las células productoras de IFN-γ para la polarización Th1. En forma similar, células productoras de IL-4 como mastocitos, NKT, Tγδ, basófilos y eosinófilos podrían determinar la diferenciación hacia el linaje Th2 (110).

La familia del receptor CD28 posee un rol clave en la regulación de la activación de células T. La interacción de CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) sobre las CPA con los receptores CD28 y CTLA-4 (Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos, CD152) sobre las células T da como resultado eventos de señalización que regulan las respuestas inmunes, incluyendo la proliferación celular y el balance entre respuestas Th1 y Th2 (111). La co-estimulación

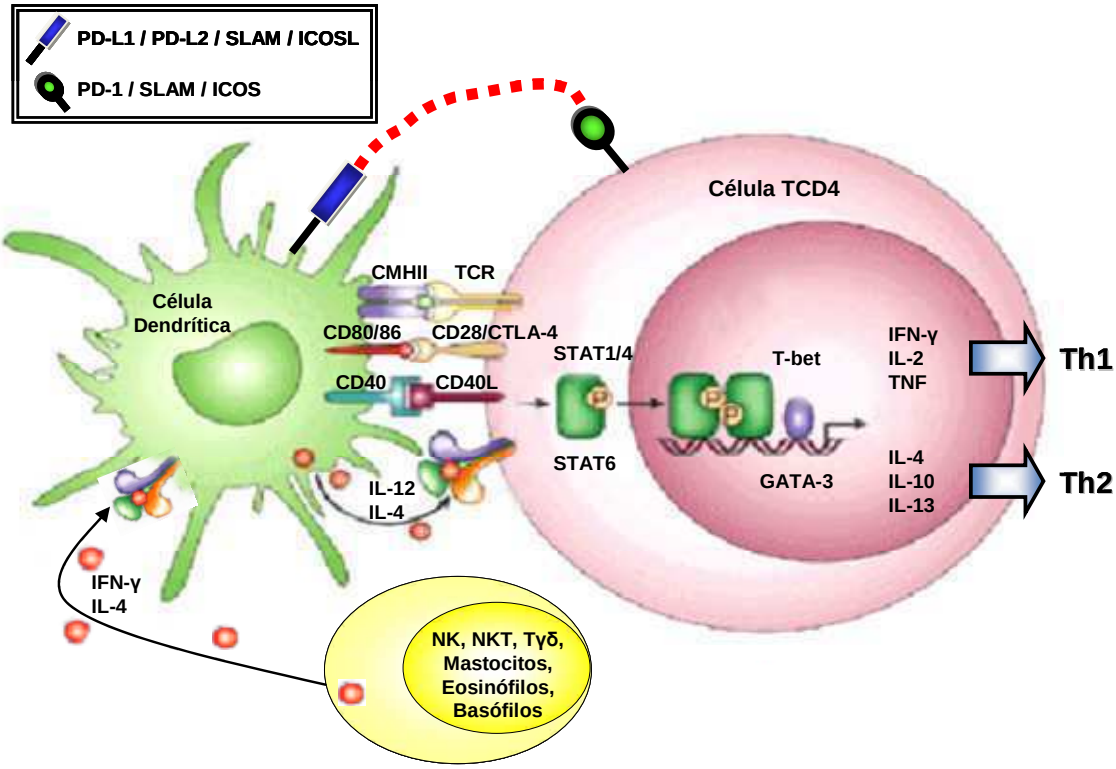

Figura 4. ***La activación y diferenciación de los linfocitos Th hacia los linajes Th1 y Th2 requiere de tres señales***. La señal 1 disparada por el reconocimiento del Ag por el TCR; la señal dos mediada por la interacción de las moléculas coestimulatorias en las CD y las células T; y la señal tres mediada por la secreción de citoquinas por CD y su reconocimiento por los receptores de las mismas en la superficie de las células T. Esta tercera señal depende de la colaboración provista por otras células del sistema inmune innato tales como células NK, NKT, linfocitos Tγδ, mastocitos, eosinófilos y basófilos. Si la colaboración es mediada por células productoras de IFN-γ como las células NK, las CD producen IL-12 induciendo la polarización de las células Th hacia el linaje Th1. (B) Alternativamente, si una célula activada productora de IL-4 como los mastocitos colabora con la CD, las células Th serán polarizadas hacia un fenotipo Th2.
(Adaptado de Nature Reviews Immunology 2; 845-858; 2002)

de células T a través de CD28 es importante para la generación de respuestas inmunes antígeno-específicas, ya que dicha interacción incrementa la diferenciación hacia célula T efectora luego de la estimulación antigénica, la expansión clonal, la magnitud y la duración de las respuestas T, la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xl y la producción de citoquinas como IL-2 (111), previniendo la inducción de anergia y favoreciendo la formación de centros germinales (112). Por otro lado, CTLA-4, una molécula que también interacciona con CD80 y CD86 con mayor afinidad y avidez que CD28 (112), induce una señal negativa, limitando de

este modo la activación T (113). La generación de ratones deficientes en el gen que codifica para CD28, demostró que esta molécula no es requerida para todas las respuestas de células T *in vivo*, ya que estos animales conservaban la capacidad de generar reacciones de hipersensibilidad retardada y respuestas de citotoxicidad mediada por linfocitos T (CTL) (114).

El rol de las moléculas co-estimulatorias en la generación de respuestas inmunes protectivas también ha sido demostrado en distintas infecciones. En la infección por *M. leprae*, ha sido observado que pacientes con lepra lepromatosa presentan una elevada expresión de CTLA-4 constitutiva *ex vivo* en CMSP en comparación con pacientes tuberculoides e individuos sanos (115). Asimismo, ha sido reportado que la expresión de CD28 se encuentra disminuida en las células de pacientes lepromatosos (115). Estos resultados demostrando una expresión alterada de las moléculas co-estimulatorias en las formas polares de lepra, podrían explicar en parte, la falla en la respuesta de linfocitos T de pacientes lepromatosos contra el antígeno específico. Con respecto a CTLA-4, *Gong y col.* observaron que la expresión de este receptor se encontraba disminuida en pacientes con tuberculosis en comparación con dadores sanos PPD^+ (116). Asimismo, *Merlo y col.* demostraron que el bloqueo específico de CTLA-4 induce un incremento en respuestas citolíticas de clones T específicos ($CD4^+$ y $CD8^+$) para *M. tuberculosis* (117). Sin embargo, en ratones ha sido descripto que si bien el bloqueo de CTLA-4 induce un aumento en la respuesta inmune específica contra *M. tuberculosis*, no se genera incremento en la eliminación de la micobacteria en el pulmón (118).

Descubrimientos recientes de nuevas moléculas homólogas a CD28/CTLA-4 y sus ligandos ha ampliado esta familia de proteínas que ahora incluyen a la molécula ICOS (co-estimulador inducible de células T) y su ligando ICOS-L (107, 119-121), y a PD-1 (receptor de muerte programada 1) con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 (122-125). Más aún, se han reportado otras moléculas co-estimulatorias que no forman parte de esta familia, entre las que se encuentra la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM). Resultados de nuestro laboratorio demostraron que SLAM, una proteína de señalización rápidamente expresada en linfocito T post-activación que induce IFN-γ (126), promueve una respuesta inmune mediada por células contra *M. leprae* (127) y que existe una cascada de eventos moleculares durante la señalización de SLAM en lepra que cooperan en la inducción de IFN-γ (128). Más aún, observamos que la molécula adaptadora SAP (proteína asociada a SLAM) e ICOS también participan en la regulación de la producción de citoquinas en infecciones micobacterianas (128-130).

Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAM) y Proteína Asociada a SLAM (SAP).

Estructura proteica.

SLAM es una glicoproteína de superficie celular perteneciente a la familia de CD2, que actúa tanto como receptor de membrana transmisor de señales intracelulares, así como molécula soluble o unida a membrana,

promotora del crecimiento celular, con funciones independientes de CD28 (126, 131, 132). Además de la forma unida a membrana (mSLAM), los linfocitos activados expresan ARNm que codifican para una forma soluble de SLAM (sSLAM), una forma de mSLAM alternativa con una cola citoplasmática truncada, y una forma intracitoplasmática (cSLAM) (126). SLAM contiene dos dominios de tipo inmunoglobulina en su región extracelular, un dominio de transmembrana y un cola citoplasmática que posee multiples motivos basados en tirosina a través de los cuales puede unirse a diferentes moléculas con motivos SH2, incluyendo tirosina e inositol fosfatasas, quinasas de las familias Src y moléculas adaptadoras (133). Hasta el momento el único ligando conocido de SLAM es SLAM por lo cual actua como un homoligando (133).

Por otra parte, SAP es una proteína intracelular que consta casi exclusivamente de un único dominio SH2, además de una corta extensión carboxilo terminal cuya función se desconoce (133).

Expresión de SLAM y SAP.

SLAM fue inicialmente descripta como una molécula de activación temprana expresada sobre la superficie de linfocitos T $CD45RO^+$ (126). Hasta el momento ha sido reportada su expresión en clones Th1 y Th2, linfocitos inmaduros (126), CD (134) y monocitos activados (135). Además, SLAM también se expresa en una población de linfocitos B periféricos, y su expresión aumenta luego de activación (126). La estimulación a través de SLAM induce perfiles de citoquinas Th1/Th0 en células T activadas por antígeno, incluyendo clones Th2 (126), sugiriendo

así que esta molécula tendría una función en los mecanismos que determinan las respuestas Th1 versus Th2. Asimismo, ha sido descripto que, durante la infección por HIV, se observa una alteración de la expresión de SLAM (136).

La expresión de SAP se limita a células inmunes, incluyendo las células T, NK, NKT, CD, macrófagos y algunas células B (137). Se ha observado que la expresión de esta proteína puede ser regulada de forma dinámica en las células inmunes. Por ejemplo, se demostró que la expresión de SAP es rápidamente disminuida en las células T de ratón después de la estimulación del TCR (138, 139). En contraste, en células NK que proliferan en presencia de IL-2 la expresión de SAP es fuertemente incrementada (140).

Señalización SLAM/ SAP.

La cola citoplasmática de SLAM puede unirse a diferentes moléculas con motivos SH2, incluyendo tirosina e inositol fosfatasas, quinasas de las familias Src y moléculas adaptadoras. Por otro lado, la proliferación de células T inducida por estimulación a través de SLAM es susceptible a los efectos inhibitorios de ciclosporina A, por lo cual ha sido sugerida la participación de miembros de la familia NF-AT en la transducción de señales inducidas por SLAM (131). Sin embargo poco se conoce acerca de las vías de señalización disparadas por SLAM y su regulación (141). En la determinación de los mecanismos por los cuales SLAM induce señalización, se identificó a SAP (142). SAP puede interactuar a través de su dominio SH2 con los miembros de la familia de receptores de SLAM. Esta familia de

receptores de transmembrana de tipo inmunoglobulina incluye a SLAM, 2B4, NTB-A, Ly9, CD84, CRACC y Ly108 (142, 143). La asociación entre la región SH2 de SAP y los miembros de la familia de SLAM involucra una secuencia conservada, localizada en el dominio citoplasmático de estos receptores. Aunque esta secuencia generalmente se repite de dos a cuatro veces, sólo una de ellas suele estar involucrada en la unión a SAP. En SLAM, las demás tirosinas de este motivo consenso se asocian a otras moléculas que contienen dominios SH2. En comparación con la mayoría de las asociaciones mediadas por dominios SH2, la interacción entre SAP y SLAM es de muy alta afinidad (143, 144). Ha sido demostrado que esta interacción tiene lugar a través de un mecanismo poco usual. La mayoría de los dominios SH2 se asocian con ligandos fosforilados en tirosina a través de dos interacciones que involucran el motivo fosfo-tirosina y residuos localizados hacia el extremo carboxi-terminal. Sin embargo, la región SH2 de SAP participa en una asociación de tres pasos que involucra la tirosina fosforilada de SLAM, así como también residuos localizados hacia el COOH-terminal y NH_2-terminal de este motivo.

Es además interesante el hecho de que la interacción SLAM/SAP puede ocurrir aún en ausencia de fosforilación, si bien el significado de este hecho es aún desconocido (143). Por otro lado, SAP es requerido para la interacción entre SLAM y FynT, tirosina-quinasa relacionada con quinasas Src. Ha sido propuesto que el reclutamiento de FynT hacia SLAM, mediado por el dominio SH2 de SAP, es un factor clave en la cascada de señalización de SLAM (145). Asimismo, ha sido sugerido que, en presencia de SAP, SLAM enviaría una señal de fosforilación específica que involucraría a la fosfatasa de inositol en 5' SHIP, a las moléculas adaptadoras Dok1 y Dok2,

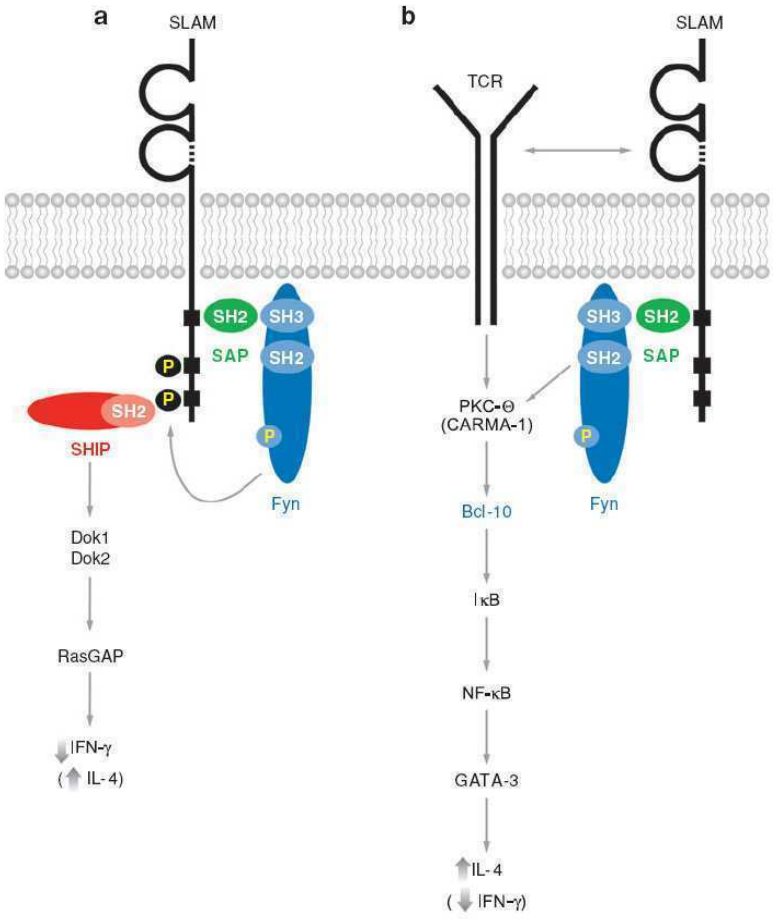

Figura 5. ***Vías de señalización mediadas por SAP.*** (a) SAP se asocia al dominio citoplasmático de SLAM. Esta interacción es mediada por la tirosina 281 (Y281) de SLAM y la arginina 32 (R32) de SAP. Esta arginina también se une al dominio SH3 de Fyn y recluta a esta proteína al complejo SLAM/SAP. Fyn luego fosforila residuos tirosina en la cola citoplasmática de SLAM. Estos residuos fosforilados actúan como sitios de anclaje para SHIP (inositol fosfatasa que contienen dominios SH2), la cuál se fosforila y une a las moléculas adaptadoras Dok1 y Dok2. Las proteínas Dok fosforiladas en tirosina se unen al dominio SH2 de RasGAP. Esta vía de señalización suprime de manera selectiva la producción de IFN-γ. (b) SAP también contribuye a la señalización a través del TCR regulando la activación de PKC-θ, Bcl-10, y NF-κB. Esta vía de señalización induce la expresión de GATA-3 y la producción óptima de IL-4 por células T $CD4^+$ estimuladas a través del CD3.
(Adaptado de Annu. Rev. Immunol. 2007. 25:337–79)

y a la proteína activadora de GTPasa Ras (Ras-GAP) (145, 146). Esta señal daría como resultado una inhibición selectiva de la producción de IFN-γ por células T activadas, una respuesta que no se observa en ausencia de SAP (Figura 5). Más aún, mutaciones en la vía de SLAM-SAP-FynT interfieren con la producción de citoquinas Th2 en respuesta a la estimulación del TCR (139). Por otro lado, la señalización a través de SLAM puede incrementar el

reclutamiento de PKC-θ inducido por el TCR, los niveles de p50, y la producción de IL-4 en una manera dependiente de SAP (147). Así, la asociación de SLAM y de SAP depende al menos del patrón de localización de estas dos moléculas, y la señalización a través de SLAM podría llevar a diferentes vías de señalización dependiendo del patrón de expresión de SAP.

Rol de SLAM y SAP en la respuesta inmune.

La importancia de la interacción SLAM-SAP en linfocitos T deriva de la observación que SAP se encuentra mutado en pacientes con el Síndrome Linfoproliferativa Ligado al cromosoma X (XLP, enfermedad disfuncional caracterizada por una respuesta inapropiada a la infección por el virus Epstein-Barr) (142, 148). La ausencia de SAP en pacientes XLP afecta las interacciones inducidas por SLAM entre linfocitos T y B. Como la unión de SLAM durante la estimulación antígeno-específica de células T induce la producción de IFN-γ y redirige fenotipos Th2 hacia respuestas Th0/Th1, una respuesta inapropiada de la subpoblación T colaboradora en pacientes XLP podría ser la consecuencia de un funcionamiento defectuoso de la vía SLAM/SAP.

SAP se encuentra predominantemente en linfocitos derivados de timo, y mutaciones en el gen de SAP afectarían los eventos de transducción de señales inducidos por SLAM en linfocitos T. En ratón, la ausencia de SAP causa hiperproliferación de las células productoras de IFN-γ, activación defectuosa del gen que codifica para IL-4 y un cambio aberrante de isotipos de inmunoglobulinas (149). Estos ratones presentan perfiles normales de linfocitos, lo cual indicaría que SAP no es crítico para el desarrollo normal de

la ontogenia linfocitaria (146). Asimismo, en estos animales, se observa un incremento de la actividad citotóxica de los linfocitos y de la secreción de IFN-γ, lo que sugiere una desregulación de múltiples ramas del sistema inmune, incluyendo linfocitos B y T. La ausencia de SAP conduce a fenotipos Th1 e inhibición de la producción de citoquinas Th2, por lo que ha sido sugerido que SAP participaría en la homeostasis linfocitaria (150). La señalización a través de la vía SLAM/SAP en líneas celulares T podría alterar el perfil de producción de citoquinas durante la activación celular T. Así, ha sido reportado que la producción de IFN-γ inducida por antígeno podría ser completamente bloqueada en células que expresan conjuntamente SLAM y SAP, mientras que no se observó impacto sobre la liberación de IFN-γ en células conteniendo SLAM o SAP solamente (145, 146). Se observó que la expresión de SAP en células de ratón inducía inhibición de la producción de IFN-γ por dichas células, pero no producía cambios en la producción de IL-2 (145, 151), indicando que SAP modularía las respuestas Th1 en células T.

Las interacciones SLAM-SLAM podrían tener lugar entre células T con otras células T activadas o con CD (134). Las células T de ratones deficientes en SAP producen más IFN-γ que las de los ratones salvajes en respuesta a estimulación a través del CD3, pero luego de estimulación con anti-CD3 y anti-SLAM tanto los ratones salvajes como los *sap*$^{-/-}$ producen altos niveles de IFN-γ (152). Estudios posteriores mostraron que la supresión de IL-4 en los ratones *sap*$^{-/-}$ es debida a un defecto específico en la inducción de GATA-3 en respuesta a las señales mediadas por el TCR (147). Luego de la activación T, SAP colocaliza con el TCR y una vía de señalización que involucra la unión de Fyn a SAP aumenta la activación de PKCθ/NF-κβ1 llevando a la generación de respuestas Th2 (147).

SLAM regula la producción de citoquinas en artritis reumatoidea (153). Más aún, en pacientes con dermatitis atópica, cuyas células T se encuentran altamente polarizadas hacia el patrón Th2, el perfil de citoquinas producido por dichas células puede ser modulado hacia la producción de citoquinas Th1 mediante señalización a través de SLAM (154). Por otro lado, si bien SLAM fue inicialmente identificado en células T activadas (126), posteriormente fue demostrada su expresión en CD maduras (134, 155). Así, SLAM podría contribuir con la capacidad de las CD de estimular a las células T dependiendo de su estado de maduración, lo cual podría ayudar a entender la regulación y colaboración entre las CD y las células T (155). Dado que SLAM está involucrado en la activación de las células T, ha sido propuesto que la expresión del mismo en las CD podría proveer una señal bidireccional en la cual las CD que interaccionan con las células T son simultáneamente y sinérgicamente activadas para montar una respuesta Th1 (134).

Asimismo, resultados previos de nuestro laboratorio en células T de pacientes con tuberculosis demostraron que mediante la interacción con SLAM, SAP envía una señal que inhibe selectivamente la producción de IFN-γ, mientras que la señalización a través de SLAM en ausencia de SAP enviaría una señal que llevaría a la generación de una respuesta Th1. Así, estos hallazgos muestran por primera vez el rol de la interacción SLAM-SAP en la generación de una respuesta inmune protectiva en una infección humana intracelular. Más aún, resultados previos de nuestro laboratorio en lepra, demostraron que la activación a través de SLAM induce una vía de señalización que incluye a NF-κB, Stat1, y T-bet, resultando en la inducción de IFN-γ, una vía que permanece inactiva en los pacientes lepromatosos no

respondedores (128). Nuestros datos confirman estudios realizados en ratones deficientes en SAP que mostraron que la ausencia de esta proteína produce un aumento de la activación T e hiperproliferación de células $CD4^+$ y $CD8^+$ productoras IFN-γ en respuesta a infección microbiana (150, 156). Más aún, células T activadas de ratones que sobreexpresan SAP disparan un incremento de producción de IL-4 así como también una disminución de la secreción de IFN-γ (145). Nuestros resultados previos, junto con estos estudios de ratón, refuerzan la hipótesis de que SAP atenúa las respuestas inmunes Th1 (146).

Molécula de adhesión celular de endotelio de plaquetas 1 (PECAM-1) o CD31.

Estructura proteica.

CD31 es una glicoproteína de aproximadamente 130 kDa que forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Contiene seis dominios de tipo inmunoglobulina en su región extracelular, un dominio de transmembrana corto de 19 residuos y un cola citoplasmática de 118 aminoácidos con splicing alternativo en los exones 10-16 y diferentes sitios potenciales para la fosforilación y modificaciones post trasduccionales (157). Los numerosos sitios de fosforilación en la cola citoplasmática pueden interactuar con fosfatasas y quinasas, lo que implica un papel de CD31 en la transducción de señales (158). Esta propiedad se debe principalmente a la presencia de dos inmunoreceptores: un ITAM (inmunoreceptor con motivo activador basado en tirosina) y un ITIM

(inmunoreceptor con motivo de inhibición basado en tirosina) (159, 160). Se han encontrado variaciones en el peso molecular entre los diferentes tipos de células en los cuales se expresa y se cree que se debe a diferentes glicosilaciones y variantes de splicing entre ellas.

CD31 puede interaccionar tanto en forma homofílica (CD31-CD31) como de manera heterofílica con otras moléculas de la superficie celular (157). Los dominios 2-3 y 5-6 se han propuesto como los sitios activos de unión para las interacciones hemofílicas (Figura 6). Las interacciones heterofílicas se encuentran mediadas por los dominios de inmunoglobulina 2-6. Los ligandos heterofílicos propuestos incluyen a una molécula expresada por glóbulos rojos (161), ADP-CD38 ribosil ciclasa (162), CD177 (163), y un ligando de CD31 expresado en células T (164).

Expresión de CD31.

La expresión de CD31 se encuentra ampliamente distribuida involucrando a células T, células NK, neutrófilos, monocitos, megacariocitos, células precursoras de médula ósea, algunas líneas tumorales, plaquetas y células endoteliales (165-167). En las células endoteliales la expresión de CD31 es constitutiva y se concentra en los bordes adyacentes formando parte de las uniones estrechas, pero hay algunos factores descritos que pueden modular la expresión, como trombospondina-1, la irradiación y la hipoxia (157). Por otro lado, las citoquinas también pueden modular la expresión de CD31. Por ejemplo, el TNF-α y el IFN-γ inducen una redistribución de esta molécula fuera de las uniones intercelulares (168). Sin embargo, la combinación de ambas citoquinas causa la desaparición de

CD31 de la membrana (169). Este efecto está relacionado con la internalización y degradación de CD31 pre-existente y la inhibición de su síntesis (169). Así, mecanismos de endocitosis y reciclaje pueden modular los niveles de expresión de CD31 (170, 171). Se ha demostrado que el patrón de expresión de CD31 en los linfocitos T se encuentra disminuido después de la inducción de activación y diferenciación hacia un perfil Th1 efector (172). Más aún, en la mayoría de los linfocitos T $CD4^+$ y en más del 50% de los T $CD8^+$ se pierde la expresión en superficie de esta molécula durante la transición de células T naive a células T de memoria (173).

Señalización de CD31.

CD31 interviene en una amplia gama de funciones, incluido el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación (174), la vasculogénesis (175), la angiogénesis (176), la regulación de monocitos, neutrófilos polimorfonucleares, y la activación de células T (158, 177). Además, esta molécula puede regular el mantenimiento de la integridad y la permeabilidad de las uniones adherentes, la organización del citoesqueleto y también puede tener actividad transcripcional y participar en la señalización de diferentes Stat (159). Por lo tanto, en contraste con las previsiones anteriores, la función de CD31 no se limita a sus propiedades adhesivas. De hecho, ha sido demostrado que esta proteína estaría íntimamente involucrada en mediar diferentes vías de transducción de señales, principalmente a través de la fosforilación de residuos de tirosina específicos localizados en el ITAM de su cola citoplasmática (159). Más aún, se había hipotetizado que este receptor podría interactuar con moléculas

que contienen dominios SH2. Posteriormente, se demostró que la fosforilación en residuos de tirosina y treonina en la cola citoplasmática de CD31 induce el reclutamiento de moléculas adaptadoras con dominio SH2, entre ellas las fosfatasas SHP-1 y SHP-2 y α/β-catenina (177).

Por otro lado, CD31 posee un motivo ITIM en su cola citoplasmática, que recluta y activa fosfatasas dependientes de tirosina (177) y modula vías de señalización dependientes del ITAM (177). El dominio ITIM también es capaz de reclutar moléculas que contienen dominios SH2, afectando a una amplia gama de eventos celulares como inhibición de la señalización mediada por citoquinas, proliferación y activación celular (159), y la atenuación de señales de transducción mediadas por el receptor de células T (173). La importancia de CD31 y sus motivos de inhibición se desprende de experimentos de co-ligación, ya que la participación de CD31 en algunas células tumorales inhibe la proliferación celular (167). También se han descripto efectos moduladores cuando se utilizan anticuerpos anti-CD31 en linfocitos T (173), monocitos, neutrófilos (178), células NK (179) y células endoteliales (180), conduciendo a la protección contra la inanición inducida por apoptosis (181, 182). Sin embargo, se ha demostrado que la transfección estable de un gen de CD31 truncado en células de carcinoma de colon, produce una disminución de la proliferación celular y un aumento de la muerte celular programada (183). Por otra parte, otros estudios mostraron que la señalización a través de CD31 aumenta la proliferación, la secreción de citoquinas y quemoquinas e incrementa CD25 en células T, un sello característico de la co-estimulación a través de receptores que contienen ITAM (158). Así, el núcleo de los residuos de tirosina 663 y 686 de los motivos ITAM/ITIM podrían transmitir señales inhibitorias o

estimulatorias dependiendo del tipo celular y de condiciones biológicas diferentes (159) (Figura 6). Interesantemente, debido a que el dominio ITIM de CD31 posee gran similitud con el dominio que se encuentra en la cola citoplasmática de SLAM, se ha sugerido que SAP podría interaccionar con CD31, regulando su función (160).

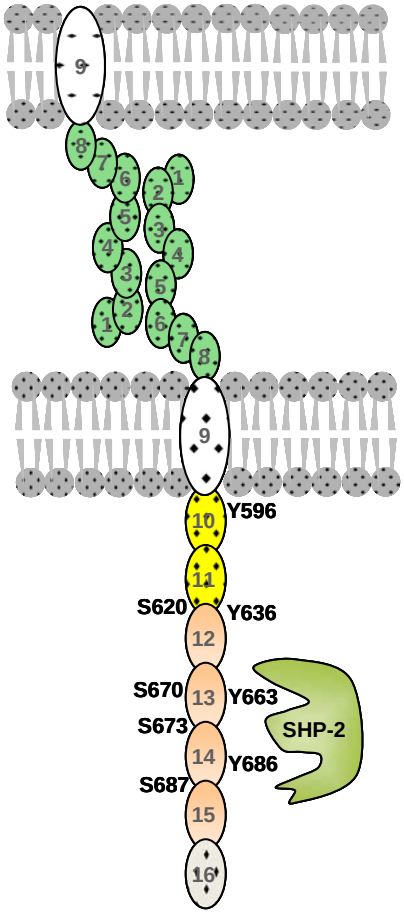

Figura 6. ***Esquema de la estructura de CD31.*** CD31 puede interaccionar a través de los dominios 2-3 y 5-6 de su región extracelular con otra molécula de CD31. Su cola citoplasmática posee múltiples sitios de fosforilación (serinas –S- y tirosinas –Y-) que reclutan fosfatasas y quinasas. Se muestra como ejemplo la interacción de SHP-2 con las tirosinas 663 y 686 ubicadas en los exones 13 y 14 respectivamente. *(Adaptado de Current Opinion in Cell Biology, 15:515-524; 2003)*

CD31 como molécula de señalización durante la respuesta inmune.

Los estudios sobre CD31 como modulador de la adhesión celular se han ampliado para demostrar su participación en la generación de otras señales de activación (158). En los neutrófilos, el tratamiento con

anticuerpos monoclonales anti-CD31 para el dominio 1 (PECAM-1.3) y el dominio 2 (hec7) dió lugar a la activación de estas células, mientras que un anticuerpo monoclonal dirigido contra otros dominios fueron ineficaces (158). En los mismos estudios, se demostró que el anticuerpo monoclonal dirigido a los dominios 1 y 2 estimulaba la producción de TNF-α por los monocitos (158). Por otro lado, se observó que CD31 participa en la adhesión de las CD inmaduras al endotelio y en la regulación de la producción de CXCL8 por estas células durante su migración a través del endotelio vascular (184).

Recientemente se demostró que los ratones deficientes en CD31 eran mucho más sensibles al shock inducido por LPS, en comparación a los animales de tipo salvaje. Por otra parte, en respuesta al LPS, estos ratones mostraron una menor supervivencia, aumento de la permeabilidad vascular, incremento de apoptosis en los órganos sólidos, niveles séricos elevados de TNF-α, IFN-γ, MCP-1 MCP-5 e IL-6 y disminución de los niveles de STAT-3 fosforilados, indicando un nuevo rol de CD31 en el mantenimiento de la integridad del endotelio, la prevención de la apoptosis mediada por STAT-3 y respuestas de fase aguda que promueven la supervivencia durante el shock séptico (159).

La señalización a través de CD31 en las células T ha sido propuesta como una vía de regulación negativa (de manera similar a CTLA-4) que incrementa el umbral para la activación de células T, y evita la estimulación de las señales de baja intensidad del TCR (185). En este sentido, la señalización de CD31 podría tener efectos preferenciales en diferentes subpoblaciones de células T y contribuir al desarrollo de diferentes funciones efectoras (173, 186). Al respecto, se ha demostrado la

fosforilación de las tirosinas del dominio citoplasmático de CD31 en respuesta al entrecruzamiento del TCR o CD31, con el subsecuente reclutamiento de la fosfatasa inhibitoria SHP-2. Cuando CD31 y SHP-2 se presentan en estrecha proximidad con el TCR, se promueve la atenuación de la liberación de calcio mediada por el TCR (173). En contraste, también se reportó que la señalización a través de CD31 en linfocitos T resulta en co-estimulación de la proliferación de las células T. Sorprendentemente, este efecto co-estimulador indujo la secreción de IL-2, IFN-γ, TNF-α, TNF-β y varias quemoquinas. Sin embargo, de los cuatro anticuerpos monoclonales que se utilizaron en este estudio, sólo los anticuerpos dirigidos al dominio 1 (PECAM-1.3) y 2 (hec7) fueron capaces de activar a los linfocitos T humanos (158).

Receptor de muerte programada 1 (PD-1).

Estructura proteica

PD-1 es un miembro relativamente nuevo de la extensa familia de moléculas regulatorias de las células T CD28/CTLA-4 y fue originalmente identificado como un gen que se encontraba fuertemente expresado por líneas celulares sometidas a la muerte celular programada (124), por la cual recibió su nombre.

PD-1 es una glicoproteína de transmembrana de tipo 1 de 288 aminoácidos que contiene un único dominio IgV-like en su región extracelular (124, 187). Su cola citoplasmática contiene dos inmunoreceptores: uno ITIM (124) y el otro ITSM (188). En humanos han

sido identificadas múltiples isoformas de PD-1, algunas de las cuales codifican para moléculas solubles de PD-1 (189) y otras para moléculas de PD-1 que resultaron ligando independientes (190).

Dos ligandos que interaccionan con PD-1 han sido reportados hasta el momento, PD-L1 (B7-H1) (122, 123) y PD-L2 (B7-DC) (125), ambos pertenecientes a la familia B7. PD-L1 y PD-L2 son glicoproteínas transmembrana de tipo 1 que poseen 290 y 274 amino ácidos respectivamente (122, 123, 125). Ambas poseen un dominio extracelular de tipo IgV en la región distal a la membrana mediante el cual interaccionan con PD-1 (122, 123, 125) y un dominio de tipo IgC en la región proximal a la membrana (122, 123). Por otro lado, sus colas citoplasmáticas poseen 30 aminoácidos en PD-L1 (123) y solo 4 en PD-L2 (125), por lo cual no se han identificado motivos de señalización en estas proteínas hasta el momento.

Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2

Hasta el momento la expresión de PD-1 no ha sido detectada en células T naive. Sin embargo, se ha observado que luego de la activación celular la expresión de PD-1 se incrementa tanto en células T como en células B y células mieloides (123, 191). Además, en células T humanas purificadas el tratamiento con citoquinas como IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21 induce la expresión de PD-1 en ausencia de señalización a través del TCR (192). Más aún, en múltiples infecciones virales persistentes, tanto en humanos como en ratón, la expresión de PD-1 es particularmente alta en la superficie de las células T CD8 exhaustas (193-195).

Los dos ligandos de PD-1 difieren significativamente en sus patrones de expresión. Mientras que ha sido reportado que PD-L1 se expresa en las células T, células B, CD, macrófagos, células NK, células no hematopoyéticas y otros tipos celulares (196, 197), la expresión de PD-L2 parecería ser mucho más restringida, limitándose hasta el momento a las CD, macrófagos y células B1 (197-200).

Mecanismos moleculares de la señalización de PD-1

Los primeros indicios de que PD-1 podría actuar como una molécula inhibitoria luego de la unión a sus ligandos surgieron de estudios que mostraron que la adición de PD-L1-Ig y PD-L2-Ig a células T salvajes podían restringir la proliferación y la secreción de citoquinas (123, 125) pero si la adición se daba en células T deficientes en PD-1 el efecto no se observaba (123, 125). La demostración formal de que PD-1 podría disparar señales inhibitorias en las células donde se expresaba, surgió de ensayos en líneas celulares B que sobre-expresaban una molécula de PD-1 quimérica activa constitutivamente (201). La estimulación a través del receptor de las células B (BCR) en estas células produjo una inhibición del crecimiento, disminución de la movilización de Ca^{++} y una reducción de la fosforilación de varias moléculas efectoras (201).

Otros trabajos demostraron que en células T las fosfatasas SHP-1 y SHP-2 co-immunoprecipitaban con la cola citoplasmática de PD-1 luego de la activación del TCR (202) interfiriendo con la activación celular por inhibición de PI3K (203) (Figura 7). Sin embargo, en ausencia del estimulo, sólo SHP-2 era reclutada por PD-1 (202) y PI3K no se inhibía. Estudios

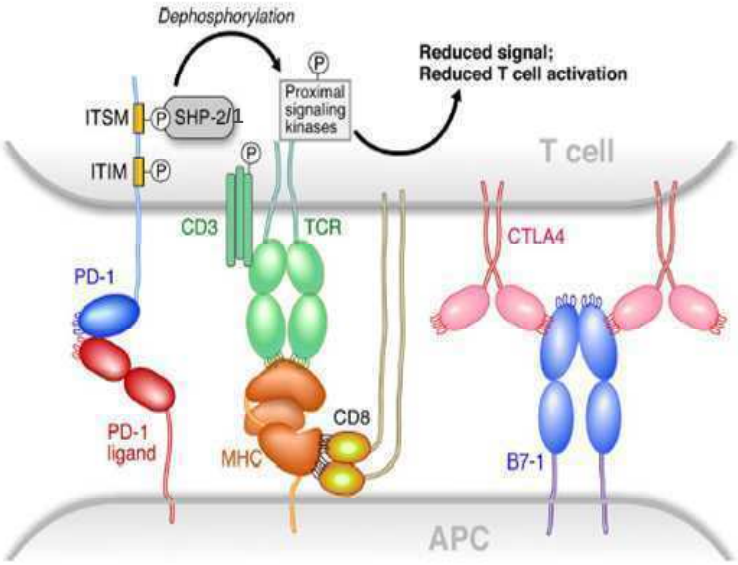

Figura 7. ***Estructura de PD-1***. La interacción de PD-1 con su ligandos (PD-L1 y PD-L2) activan vías de señalización que reclutan a las fosfatasas SHP-1 y SHP-2 reduciendo las señales emitidas a través del TCR. *(Adaptado de Proc Natl Acad Sci U S A 105(30):10275-6)*

bioquímicos utilizando células T humanas demostraron que PD-1 y CTLA-4 inhiben la activación de las células T por distintos mecanismos. En ambas proteínas la señalización a través de ellas reduce la fosforilación de Akt en respuesta a la estimulación TCR/CD28, sin embargo, CTLA-4 inhibe Akt por un mecanismo dependiente de PP2A y PD-1 lo hace a través de la inhibición PI3K la cual fosforila Akt (203). Por lo tanto, estos estudios sugieren que, cuando se produce la activación, PD-1 recluta a las fosfatasas SHP-1 y SHP-2 a la sinapsis inmunológica (204), donde éstas pueden interferir con la activación de las células T mediante la inhibición de PI3K y la subsecuente fosforilación y activación de Akt.

Rol de PD-1 en la respuesta inmune

El rol de PD-1 y sus ligandos en la regulación de enfermedades autoinmunes ha sido investigado en múltiples modelos animales. Distintas cepas de ratones deficientes en PD-1 desarrollaron patologías que van desde glomerulonefritis en ratones C57/B16 (205), cardiomiopatias en BALB/c (206) hasta el desarrollo de enfermedades autoinmunes en ratones NOD debido a una fuerte polarización Th1 de las células T (207). De manera similar, ratones deficientes en PD-L1 mostraron una respuesta de células T exacerbada y una mayor susceptibilidad a la encefalitis autoinmune experimental (EAE) y a hepatitis autoinmune experimental (208, 209) mientras que ratones deficientes en PD-L2 no sólo mostraron un incremento de la activación de las células T sino que fueron incapaces de generar tolerancia en respuesta a un antígeno oral (210). En correlación, también ha sido demostrado que PD-1 y sus ligandos participarían en la tolerancia materno-fetal (211), en la regulación de respuestas aloinmunes (212-214), tolerancia a injertos (215), asma (216, 217), y conjuntivitis alérgica experimental (218).

Más aún, observaciones recientes demostraron que múltiples líneas tumorales expresaban PD-L1 (219, 220) lo que ha llevado a investigar el potencial rol de PD-1 y sus ligandos sobre la regulación de la inmunidad tumoral. En humanos, una alta expresión de PD-L1 en células tumorales correlacionó con mal pronóstico en cáncer de ovario (221), de riñón (222-224), urotelial (225, 226), de páncreas (227), de pulmón (228) y gástrico (229). Ha sido sugerido que el mecanismo por el cual los tumores asociados a PD-L1 podrían evadir la respuesta inmune mediada por células T involucraría la inducción de la muerte de las células T (219) o inducción de resistencia de las células tumorales a la apoptosis mediada por estas células

(230). En contraste, PD-L2 promovería a las células tumorales por una vía independiente de PD-1 (231), la cual involucraría la interacción de PD-L2 con un receptor co-estimulatorio aún no identificado que también podría unirse a PD-L1 (122, 232-234). En ratones el bloqueo de PD-1 o PD-L1 podría mediar protección ante algunos tumores (220, 235-237), y ensayos clínicos con anticuerpos anti-PD-1 humanizados se encuentran en fase 1 para el tratamiento de pacientes con neoplasias hematológicas avanzadas (238).

El descubrimiento de que PD-1 es incrementado en células T CD8 efectoras exhaustas durante infecciones virales persistentes hace que PD-1 sea un atractivo blanco terapéutico en infecciones crónicas. El tratamiento con anti-PD-L1 en ratones infectados con el virus crónico de la coriomeningitis linfocítica restauró la habilidad de las células T CD8 exhaustas a proliferar, a secretar citoquinas, a matar blancos infectados, y a disminuir la carga viral en los animales (193). Del mismo modo, altos niveles de expresión de PD-1 fueron observados en células T no funcionales durante la infección por HIV, y anti-PD-1 y anti-PD-L1 parecerían capaces de restaurar la proliferación y funciones efectoras de estas células, al menos *in vitro* (194, 195). Resultados similares se han observado durante las infecciones crónicas con el virus de hepatitis B (239), virus de hepatitis C (240-243), virus de herpes simples (244) y por *Helicobacter pylori* (245).

OBJETIVOS

Objetivo General.

El objetivo general de la presente tesis fue estudiar las bases celulares y moleculares que conducen al establecimiento y mantenimiento de respuestas efectoras de linfocitos T (LT) en tuberculosis. Para ello, investigamos el rol de proteínas de señalización en la modulación del establecimiento de respuestas de citoquinas y citotóxicas por LT durante la infección por *Mycobacterium tuberculosis.*

Nuestra Hipótesis de trabajo fue i) que podría existir una asociación entre SAP-CD31 la cual impactaría sobre vías de señalización reguladoras del IFN-γ durante la infección producida por *M. tuberculosis*; ii) que la vía de señalización de PD-1 participaría en la modulación de las funciones efectoras de los linfocitos Th en la tuberculosis humana iii) que la combinación de diferentes vías de señalización regularían de manera conjunta la secreción de IFN-γ durante la infección activa por *M. tuberculosis*; iv) que las células Th17 podrían participar en la respuesta ionmune contra *M. tuberculosis* y que la vía de PD-1 podría regular a las células productoras de IL-17.

A fin de corroborar nuestras postulaciones, planteamos los siguientes objetivos específicos.

1. *Estudio de la función de CD31 y SAP en la tuberculosis pulmonar activa.*

1.1. Estudiar la expresión de CD31 durante la infección activa por *M. tuberculosis*.

1.2. Investigar el efecto de la señalización a través de CD31 en la tuberculosis pulmonar activa.

1.4. Estudiar la posible interaccion entre CD31 y SAP durante la infección por *M. tuberculosis*.

1.5. Investigar el efecto de la señalización a través de CD31 y su relación con SAP en individuos con mutaciones en el gen de SAP (pacientes XLP).

2. *Estudio de la función de PD-1 en los linfocitos T de pacientes con tuberculosis activa.*

2.1. Analizar la expresión de PD-1 en tuberculosis.

2.2. Estudiar la regulación ejercida por el IFN-γ sobre la expresión de PD-1 en pacientes con infección activa por *M. tuberculosis*.

2.3. Investigar la relación entre PD-1 e IFN-γ en pacientes con tuberculosis.

2.4. Analizar la expresión de los ligandos de PD-1 y su posible regulación por IFN-γ durante la tuberculosis.

2.5. Investigar el efecto de la señalización a través de PD-1 en la tuberculosis pulmonar activa

2.6. Estudiar el efecto sobre la producción de IFN-g del bloqueo de la vía de PD-1 en conjunto con la señalización a través de SLAM en pacientes con tuberculosis.

3. Análisis de la función de la población s Th17 en pacientes infectados con *M. tuberculosis.*

3.1. Analizar la producción de IL-17 e IFN-γ en pacientes con tuberculosis.

3.2. Estudiar la expresión de moléculas co-estimulatorias en la superficie de la población Th17 en pacientes con infección activa por *M. tuberculosis*.

3.3. Investigar el efecto de la señalización de PD-1 sobre la producción de IL-17 y sobre las células Th17 en tuberculosis.

MATERIALES Y METODOS

Individuos participantes.

Participaron en este estudio individuos con tuberculosis pulmonar activa provenientes de la División de Tisioneumonología del Hospital F. J. Muñiz, los cuales fueron evaluados a su ingreso. El diagnóstico de tuberculosis fue establecido según datos clínicos y radiológicos, conjuntamente con la identificación de bacilos ácido-alcohol resistente en esputo, mediante la coloración de Ziehl-Neelsen. Todos los pacientes integrantes de este estudio habían recibido menos de una semana de tratamiento con drogas anti-tuberculosas y no presentaban ninguna otra patología asociada al momento de la toma de muestra. También se incluyeron en este estudio dos individuos con Síndrome Linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP) diagnosticados en el "International XLP Registry Headquarters" (Centro Médico de la Universidad de Nebraska, Omaha, NE, (246)). Como controles, participaron individuos sanos vacunados con BCG. Se obtuvo sangre periférica de todos los individuos integrantes del estudio en tubos heparinizados, luego de recibir su consentimiento informado. En algunos casos, se recibieron muestras de derrames pleurales de pacientes con tuberculosis obtenidas con fines terapéutiocos por toracentesis. Todos los estudios realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Muñiz.

Los pacientes con tuberculosis fueron clasificados de acuerdo con el criterio previamente descripto por Pasquinelli et. all (129). Brevemente, dos grupos de individuos fueron identificados basados en la respuesta de las células T *in vitro* a un extracto de *M. tuberculosis* (ver *Antígeno*): pacientes respondedores o individuos que cuyas CMSP proliferaron

significativamente en presencia del antígeno (índice de proliferación ≥ 4), secretaron marcadamente más IFN-γ que las CMSP cultivadas sin antígeno (índice de producción ≥ 34), y mostraron un incremento del porcentaje de la expresión de SLAM en la superficie de las células T ≥ 8. Los pacientes bajos respondedores, por el contrario exhibieron baja respuesta proliferativa (índice de proliferación < 4), baja secreción de IFN-γ (índice de producción < 34), y un incremento de la expresión de SLAM < 8 en repuesta al antígeno. Cuando un paciente cumplía con dos de lo tres criterios para un grupo fue clasificado en dicho grupo.

Antígeno.

Para todo el trabajo, se utilizó un sonicado de *M. tuberculosis* de la cepa virulenta H37Rv (*M.tb*) gentilmente provisto por la Universidad de Colorado (Mycobacteria Research Laboratorios, Colorado State University, Fort Collins, CO).

Cultivos celulares.

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y de fluidos pleurales (CMFP) fueron aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (G.E Healthcare, Chalftont St. Giles, UK). Las CMSP (1x106/ml) fueron cultivados en presencia del sonicado de M. tuberculosis (10 µg/ml) o PHA-M (2.5 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en placas de 6 (TPP Renner Gmbh), 24 (TPP Renner Gmbh) ó 96 (Cellstar, Greiner Bio-One) pocillos con medio RPMI 1640 (GIBCO, Carlsbad, CA)

suplementado con gentamicina, glutamina (2mM, Sigma-Aldrich) y suero humano al 10%; en estufa a 37ºC y con 5% de CO2. A distintos tiempos, las células así estimuladas fueron cultivadas en presencia/ausencia de anticuerpos monoclonales o proteínas recombinantes como se describe posteriormente.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos y proteínas recombinantes:

Anticuerpos agonistas: anti-CD31 (clon PECAM 1.2, 5µg/ml, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), anti-SLAM (clon A12, 10µg/ml; eBioscience, San Diego, CA).

Anticuerpos bloqueantes: anti-PD-1 (clon J116, 5µg/ml, eBioscience), anti-PD-L1 (clon MIH1, 2µg/ml, eBioscience), anti-PD-L2 (clon MIH18, 2µg/ml, eBioscience), anti-IFN-γ (clon MD-1, 15mg/ml, eBioscience).

Proteínas recombinantes humanas: rCD31 (100µg/ml, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), IFN-γ (7.5ng/ml; eBioscience).

En todos los experimentos que se utilizaron anticuerpos específicos, se incluyeron cultivos paralelos con anticuerpos irrelevantes como control de unión inespecífica (controles de isotipo).

Ensayos de Proliferación.

Las CMSP fueron estimuladas por 5 días en presencia o ausencia de *M.tb* y se adicionó timidita tritiada ([^{3}H]-T, 5µCi/ml) durante las últimas 16 horas de cultivo. Posteriormente, las células fueron cosechadas y se midió la incorporación de [^{3}H]-T en un contador de centelleo.

ELISA.

En diferentes experimentos, CMSP, CMFP o poblaciones celulares purificadas fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de citoquinas recombinantes o anticuerpos monoclonales a distintos tiempos. Seguidamente, utilizando Kits comerciales, se determinó la producción de IFN-γ (eBioscience), IL-10 (Endogen) o IL-17 (eBioscience) en los sobrenadantes de cultivo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Citometría de Flujo.

CMSP y CMFP fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de citoquinas recombinantes o anticuerpos monoclonales por diferentes tiempos, según el diseño experimental. A continuación se determinó la expresión de SLAM, CD31, PD-1, PD-L1, PD-L2 en la superficie de los linfocitos T $CD3^+$, $CD4^+$ y/o $CD8^+$. Para analizar la expresión de CD31, PD-1, PD-L1 y PD-L2 se utilizó un método indirecto de detección. Así, las células fueron marcadas con sólo uno de los anticuerpos monoclonales específicos para cada una de estas moléculas (sin marca) por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego las células fueron lavadas mediante centrifugación a 2000rpm con buffer FACS (PBS 1 X + suero bovino fetal al 2%) y se descartó el sobrenadante. Seguidamente las células fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con un anticuerpo anti-mouse marcado. A continuación, las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales específicos (marcados) anti-CD3,

anti-CD4, anti-CD8 y/o anti-SLAM por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. En diferentes experimentos, y a fin de dedeterminar la expresión de SLAM y PD-1 en la superficie de los linfocitos T $CD3^+$, $CD4^+$ y/o $CD8^+$, se utilizó un método directo de detección. Así, las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales específicos por 30 minutos a temperatura ambiente.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales específicos no marcados: anti-CD31 (clon 5H2, IgG1, gentilmente provisto por el Dr. Villela, Servei d'Immunologia, Hospital Clinic, Barcelona), anti-PD-1 (clon J116, eBioscience), anti-PD-L1 (clon MIH1, eBioscience), anti-PD-L2 (clon MIH18, eBioscience).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales específicos marcados: anti-CD3 (UCHT1, eBioscience), anti-CD4 (OKT4, eBioscience), anti-CD8 (OKT8, eBioscience), anti-SLAM (A12, eBioscience) y anti-PD-1 (clon J116, eBioscience).

Como control de unión inespecífica, todas las muestras experimentales fueron incubadas en paralelo en presencia de anticuerpos irrelevantes (controles de isotipo).

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), FacsAriaI (BD Biosciences) o FacsAriaII (BD Biosciences).

Detección de IFN-γ e IL-17 intracelular.

Para determinar la producción de IFN-γ e IL-17 a nivel de células individuales, las CMSP o las CMFP fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales durante 5 días. A continuación, se

adicionó Brefeldina (10µg/ml, Sigma-Aldrich) o GolgiStop® (1µl/ml, BD Biosciences) durante las últimas 5 horas de cultivo, a fin de inducir la acumulación intracelular de citoquinas sintetizadas de novo. Luego las células fueron marcadas en superficie como fue descripto anteriormente, con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD31, anti-PD-1, anti-PD-L1 y anti-PD-L2. La marcación intracelular fue realizada con anticuerpos anti-IFN-γ (clon 4S.B3, eBioscience) y anti-IL-17 (clon eBio64CAP17, eBioscience) utilizando un kit comercial (eBioscience). Como control negativo se utilizaron células estimuladas, que fueron incubadas en presencia de un anticuerpo monoclonal irrelevante, a fin de comparar la unión inespecífica. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo.

Western blot.

CMSP de pacientes con tuberculosis, pacientes XLP y dadores sanos fueron estimuladas durante 15 minutos o 5 días con *M.tb* y seguidamente se prepararon extractos celulares totales. Para ello, las células fueron lavadas y solubilizadas en buffer de lisis (Tris 50mM -pH 8-, Nonidet P40 1%, NaCl 200mM, Glicerol 10%, EDTA 0,5mM y Cocktail Inhibidor de Proteasas, Sigma-Aldrich), y cultivadas a 4°C por 1 h. Luego se cuantificaron las proteínas en las muestras utilizando el kit de microBCA (Pierce). Así, se sembraron cantidades equivalentes de proteína y se corrieron en en geles de poliacrilamida-bis-acrilamida al 7,5% ó al 12%. Posteriormente se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, GE Healthcare) y la incubación en presencia de los anticuerpos específicos anti-SAP (1/1000, FL-128, Santa Cruz Biotech.), anti-CD31 (1/300, C-20, Santa

Cruz Biotech.) o anti-β-actina (1/200, C300, Santa Cruz Biotech.). Luego de sucesivos lavados, se realizó el revelado del anticuerpo unido específicamente utilizando anticuerpos policlonales anti-cabra conjugados con streptavidina peroxidasa (HRP) (1/2500, Chemicon International, Temecula, CA, USA) o anti-conejo conjugados con HRP (1/3000, Chemicon International, Temecula, CA) mediante quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare). Para la comparación de los niveles de SAP o CD31 en las diferentes muestras, la concentración de proteínas fue normalizada al producto equivalente de b-actina. Los geles de poliacrilamida revelados fueron escaneados, densitometrados y los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias (UA).

Inmunoprecipitación.

CMSP de pacientes con tuberculosis, pacientes XLP y dadores sanos fueron estimuladas durante 15 minutos o 5 días con *M.tb* y seguidamente se prepararon extractos celulares totales como fue previamente descripto. Los lisados fueron inmunoprecipitados utilizando anticuerpos policlonales específicos anti-SAP (3µg/ml), anti-CD31 (3µg/ml) o un anticuerpo irrelevante, siguiendo las instrucciones del fabricante (eBioscience, San Diego, CA, USA). Brevemente, los extractos fueron incubados con los anticuerpos anti-SAP o anti-CD31 más el agregado de TrueBlot™ anti-conejo Ig IP Beads (eBioscience) o proteína G Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnologies), y los inmunoprecipitados fueron obtenidos por centrifugación a 10.000 RPM por 1 minuto o a 2.500 RPM por 30 minutos,

respectivamente. A continuación, la expresión de CD31 o SAP fue determinada por Western Blot como se describió previamente.

Purificación de células T CD31$^+$ y CD31$^-$.

CMSP de pacientes con tuberculosis y dadores sanos fueron incubados por 16 horas en medio completo para permitir la adherencia de las células monocíticas a la placa. Luego, se recuperaron las células no adherentes y las poblaciones CD31$^+$ y CD31$^-$ fueron obtenidas a través de dos rondas de selección positiva utilizando beads magnéticas (Dynal beads, Dynal Biotech, Norway) y anti-CD31 (clon 2B3, IgG1, gentilmente provisto por el Dr. Villela, Servei d'Immunologia, Hospital Clinic, Barcelona). Seguidamente, las células fueron lavadas, contadas y se determinó su pureza mediante citometría de flujo (ambas fracciones fueron obtenidas con pureza mayor al 90%). A continuación, las fracciones CD31$^+$ y CD31$^-$ fueron cultivadas en presencia del antígeno más células presentadoras como ha sido descrito previamente por (247). Por último, se determinó la producción de IFN-γ mediante ELISA

Degranulación lítica.

Para medir la degranulación lítica de los linfocitos T CD8+, se utilizó la expresión de CD107a/b lysosome-associated membrane protein-1/2 (LAMP-1/2) como previamente ha sido descrito por *Betts y col.* (248). Brevemente, CMSP y CMFP de pacientes con tuberculosis y dadores sanos fueron estimuladas con M.tb en presencia/ausencia de los anticuerpos

bloqueantes anti-PD-1 +/- PD-Ls En las ultimas 6 horas del cultivo se adicionaron directamente a las células los anticuerpos anti-CD107a/b-FITC (H4A3/H4B4, 20µl/ml, BD Biosciences) junto con el reactivo GolgiStop® (durante las ultimas 5 horas del cultivo), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). Finalmente, las células fueron avadas, marcadas con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD3 y analizadas por citometría de flujo, como ha sido descrito previamente. Todas las muestras experimentales fueron incubadas en pararlelo con de anticuerpos irrelevantes (controles de isotipo).

Análisis estadístico.

El test de Wilcoxon fue utilizado para el análisis de muestras pareadas y el test de Mann-Whitney para muestras no pareadas. Se realizó análisis de regresión simple y el test del coeficiente de correlación de Spearman para estudiar la relación entre variables. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

La asociación entre CD31 y SAP regula la producción de IFN-γ durante la infección con M. tuberculosis.

Expresión de CD31 en pacientes con tuberculosis y en dadores sanos.

La expresión de CD31 se encuentra ampliamente distribuida en varios tipos celulares (165-167). Más aún, se ha demostrado que la expresión de CD31 en los linfocitos T disminuye luego de la activación y maduración a células Th1 efectora (172). Por ello, inicialmente estudiamos la expresión de CD31 en células T de pacientes con tuberculosis y de dadores sanos. Observamos que la expresión basal de CD31 fue similar tanto en pacientes con tuberculosis con fuerte inmunidad frente a *M. tuberculosis* (Pacientes Respondedores) (129), como en pacientes con débil respuesta de las células T a la bacteria (pacientes bajos respondedores) (129) y en dadores sanos (Figura 1A).

A continuación se examinó la expresión de CD31 en respuesta al sonicado de *M. tuberculosis (M.tb)*. Luego de la estimulación antigénica, el porcentaje de los linfocitos T $CD3^+CD31^+$ disminuyó significativamente en aquellos individuos que responden fuertemente a *M.tb* (pacientes respondedores y dadores sanos) en comparación con la expresión del receptor en células sin estímulo (Figura 1B-1C). En contraste, en los pacientes bajos respondedores, se detectó un aumento significativo en el porcentaje de $CD3^+CD31^+$ linfocitos T después de la estimulación con *M.tb* en comparación con las células cultivadas con medio (Figura 1B-1C). Por lo

tanto, nuestros datos sugerirían que la expresión de CD31 es regulada por *M. tuberculosis* en asociación con la maduración de las células Th hacia un fenotipo efector.

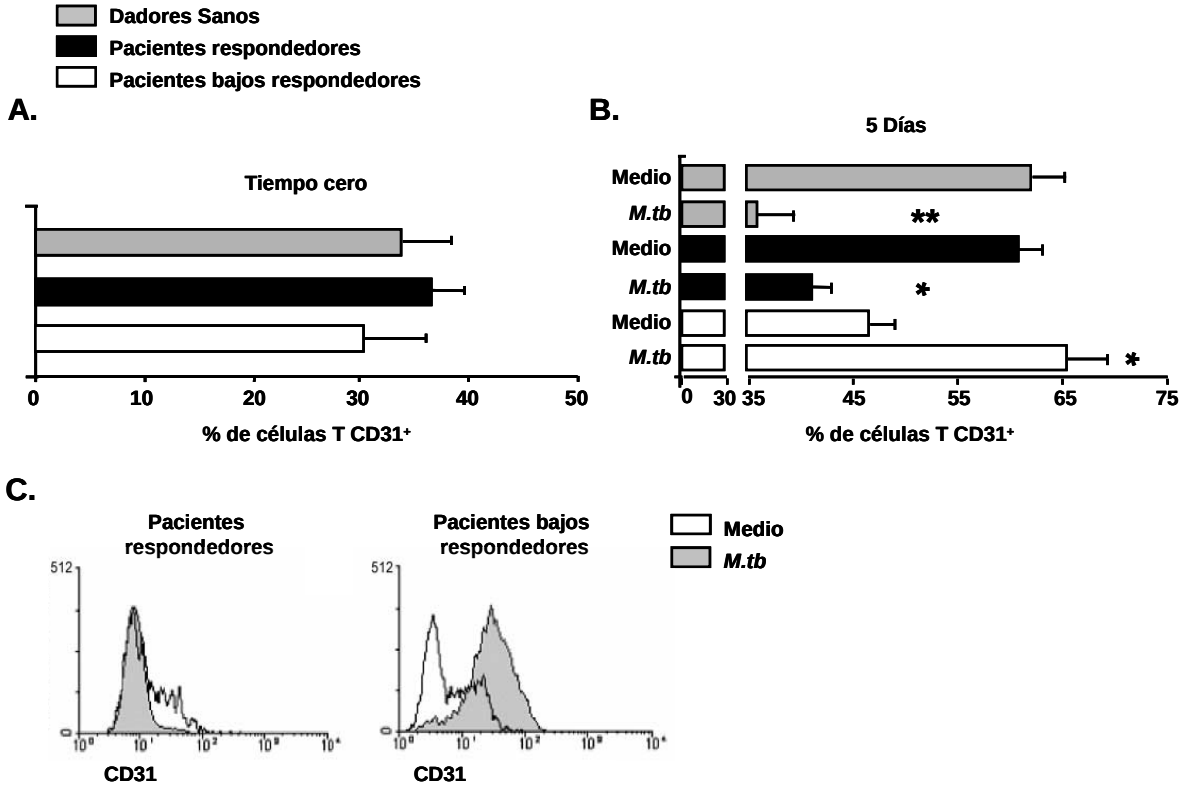

Figura 1. *Expresión de CD31 en pacientes con tuberculosis y dadores sanos*. La expresión de CD31 en CMSP de pacientes con tuberculosis respondedores, bajos respondedores y de dadores sanos fue determinada por citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células CD3+. A. Expresión basal de CD31. B-C) Expresión de CD31 en respuesta a 5 días de estimulación con *M.tb*. A-B) Cada barra representa la media del porcentaje de células T $CD31^+$ ± SEM (10 individuos por grupo). B-C) $*p<0.01$; $**p<0.001$ Wilcoxon Rank Sum test. C) Ejemplo representativo de pacientes con tuberculosis.

Efecto de la señalización de CD31 sobre la producción de citoquinas durante la estimulación con *M. tuberculosis*.

CD31 interviene en una amplia gama de funciones, incluido el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación (174), la

vasculogénesis (175), la angiogénesis (176), la regulación de monocitos, neutrófilos polimorfonucleares, y la regulación de la activación de células T (158, 177). Sin embargo, el papel de la señalización de CD31 después de la estimulación antigénica en infecciones humanas no había sido demostrado aún. Por lo mencionado, CMSP de individuos respondedores fueron cultivadas en presencia de *M.tb* en conjunto con un anticuerpo agonista anti-CD31 o con CD31 recombinante. A continuación se determinó la producción de IFN-γ e IL-10 mediante ELISA. Como se puede observar en la Figura 2, la estimulación simultánea con el antígeno y el anticuerpo

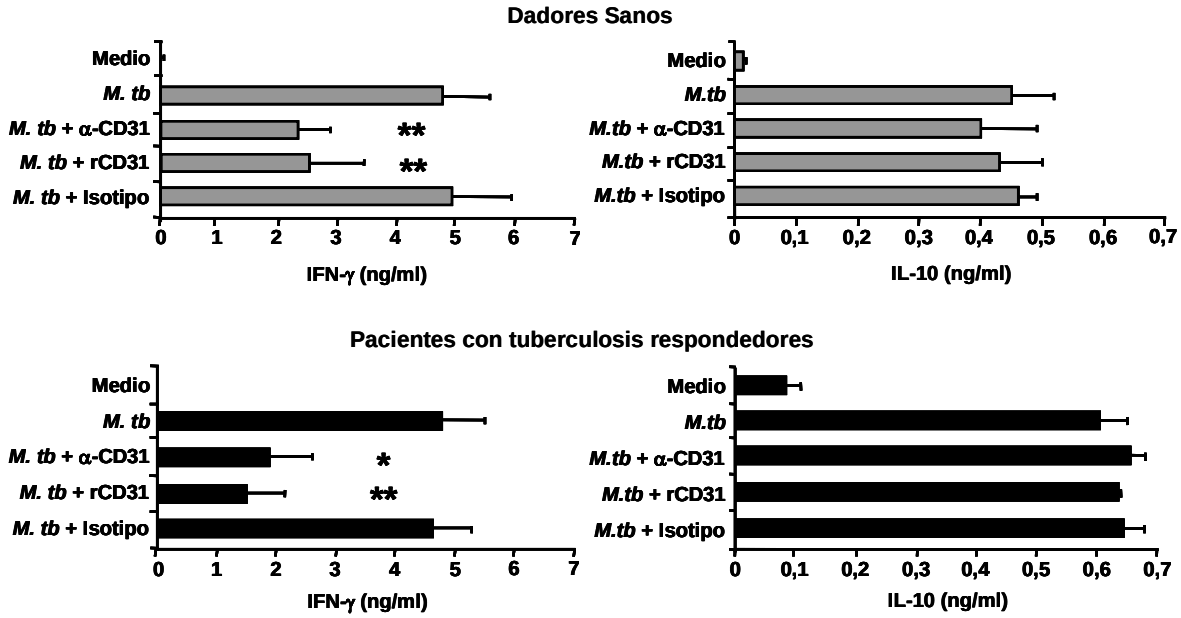

Figura 2. *Efecto de la señalización a través de CD31 sobre la producción de citoquinas en pacientes con tuberculosis y dadores sanos.* CMSP de pacientes con tuberculosis respondedores y de dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* ± anticuerpo monoclonal α-CD31, CD31 recombinante humano (rCD31) o control de Isotipo. Luego de 5 días, la producción de IFN-γ o de IL-10 se determinó por ELISA. Cada barra representa la media ± SEM de los valores de IFN-γ o de IL-10 producidos por cada grupo (15 individuos por grupo). Los valores de p se calcularon comparando la media del nivel de citoquina producido por las células estimuladas con *M.tb* contra la media del nivel de citoquina producido por las células cultivadas en presencia de *M.tb* + α-CD31 o de *M.tb* + rCD31. *$p<0.01$; **$p<0.001$, Wilcoxon Rank Sum test.

agonista o la proteína recombinante indujo una marcada y significativa inhibición de la producción de IFN-γ en comparación con las células cultivas

con *M.tb* solamente (Figura 2A). Sin embargo, la señalización a través de CD31 no modificó la secreción de IL-10 en ninguno de los grupos estudiados (Figura 2B), lo que sugiere que la señalización de CD31 inhibe específicamente las respuestas Th1.

Regulación del IFN-γ por los linfocitos T CD31$^+$.

Dado que CD31 inhibe la producción de IFN-γ inducida por *M.tb*, a continuación se seleccionaron los linfocitos T CD31$^+$ y CD31$^-$ a partir de CMSP. Posteriormente, cada población fue estimulada con el antígeno en presencia de células presentadoras (ver materiales y métodos) y se determinó la producción de IFN-γ. Interesantemente se observó que únicamente las células T CD31$^-$ produjeron cantidades significativas de IFN-γ, comparables con las producidas por las CMSP (Figura 3A). Sin embargo, *M.tb* no indujo niveles significativos de IFN-γ en las células T CD31$^+$ (Fig. 3A). Más aún, observamos que en pacientes respondedores, la mayoría de las células IFN-γ$^+$ eran CD31$^-$, y que el total de las células CD31$^+$ disminuía más del 50% luego de la estimulación antigénica (Figura 3B). En contraste, en pacientes de baja respuesta observamos que la estimulación antigénica produjo un aumento del 100% de la población CD31$^+$, no detectándose células T IFN-γ$^+$ (Figura 3B). Por lo tanto, nuestros estudios demuestran que CD31 regula de manera autócrina la producción de IFN-γ. Así, en pacientes con tuberculosis con una fuerte respuesta al antígeno, la estimulación con *M.tb* regula negativamente la expresión de CD31 y son estas células CD31$^-$ las que producen IFN-γ (Figura 3A-B), mientras que por el contrario, en individuos con baja respuesta, el porcentaje de linfocitos

CD31$^+$ aumenta, la subpoblación de linfocitos T CD31$^-$ disminuye y no se produce IFN-γ en respuesta al patógeno (Figura 1B, Figura 3B)

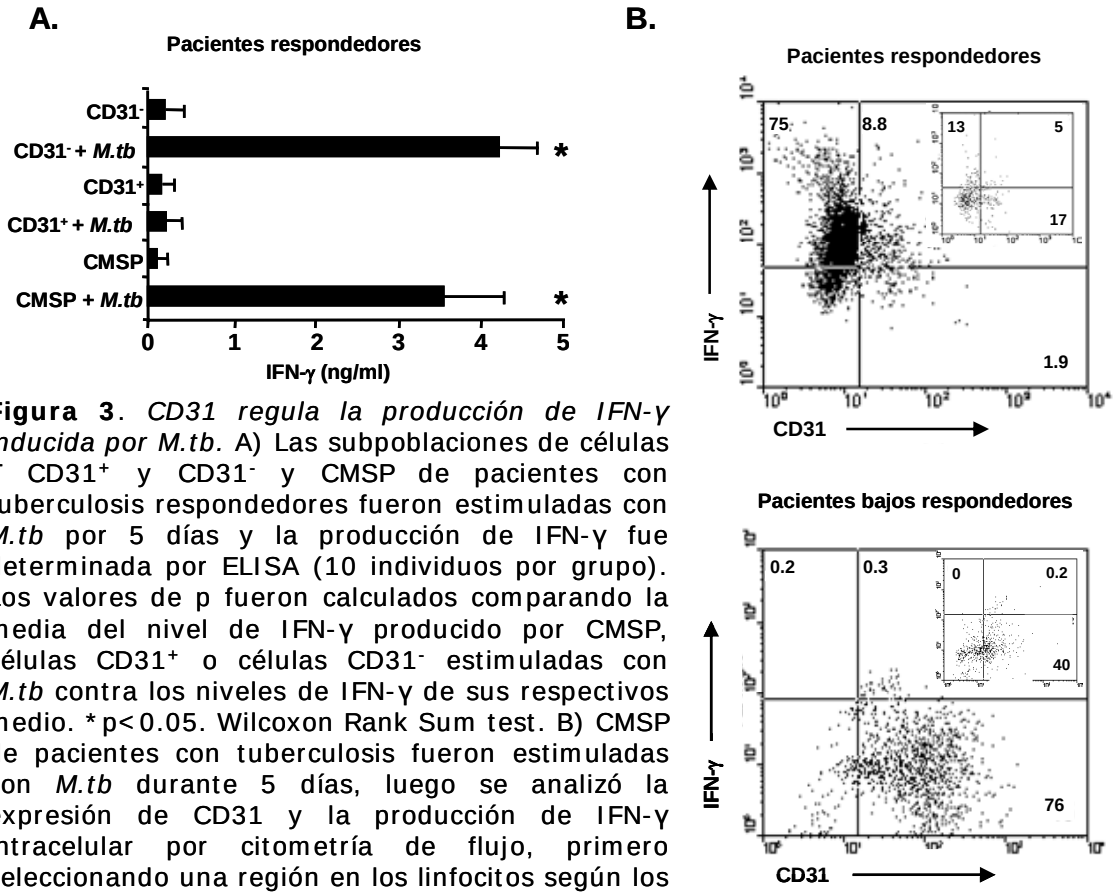

Figura 3. *CD31 regula la producción de IFN-γ inducida por M.tb.* A) Las subpoblaciones de células T CD31$^+$ y CD31$^-$ y CMSP de pacientes con tuberculosis respondedores fueron estimuladas con *M.tb* por 5 días y la producción de IFN-γ fue determinada por ELISA (10 individuos por grupo). Los valores de p fueron calculados comparando la media del nivel de IFN-γ producido por CMSP, células CD31$^+$ o células CD31$^-$ estimuladas con *M.tb* contra los niveles de IFN-γ de sus respectivos medio. *p< 0.05. Wilcoxon Rank Sum test. B) CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* durante 5 días, luego se analizó la expresión de CD31 y la producción de IFN-γ intracelular por citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células CD3$^+$. Ejemplo representativo de 7 pacientes de cada grupo analizados. En el inserto se muestran las células sin estimulo.

Papel de CD31 en la modulación de la expresión y función de SLAM en tuberculosis.

Con el fin de profundizar el análisis del fenotipo de las células productoras de IFN-γ inducida por el antígeno seguidamente analizamos la expresión de SLAM, CD31 e IFN-γ en linfocitos T de pacientes con tuberculosis. Nuestros resultados mostraron que más del 80% del total de

los linfocitos T CD31$^-$ expresaban SLAM en aquellos pacientes con una fuerte respuesta inmunológica frente a *M. tuberculosis*, mientras que en los

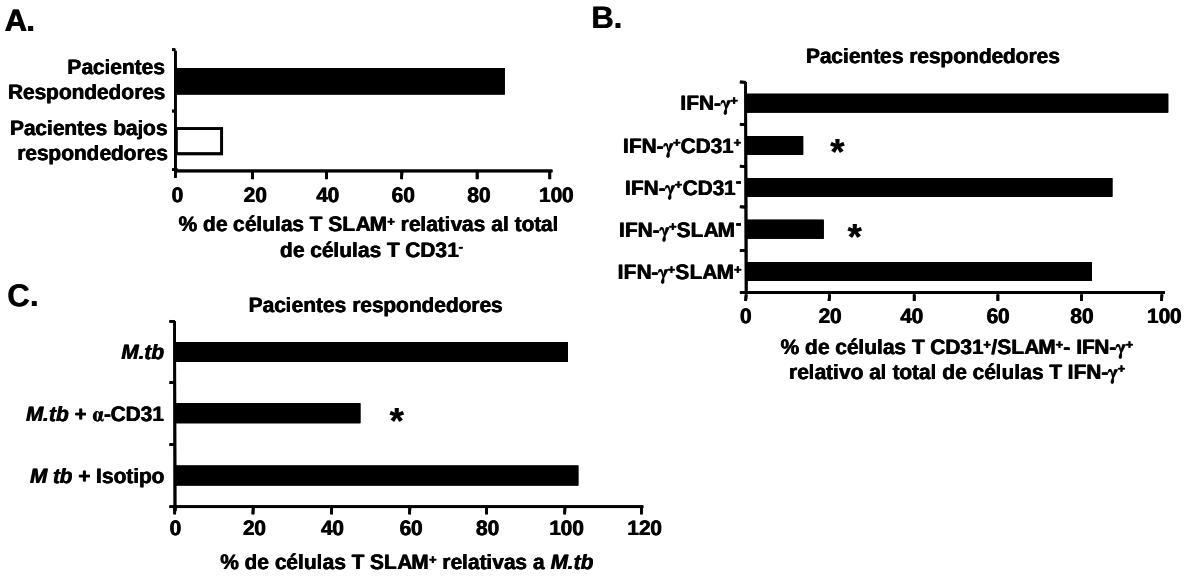

Figura 4. *Rol de CD31 en la modulación de la función y expresión de SLAM en respuesta a M.tb.* CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* durante 5 días, luego la expresión de CD31, SLAM y/o IFN-γ fue analizada por citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células CD3$^+$. A) Las barras muestran la media del porcentaje de células T CD31$^+$SLAM$^+$ relativas al total de células T CD31$^+$ luego de estimulación con *M.tb* calculado como: % de células T CD31$^+$SLAM$^+$ x 100/% de células T CD31$^+$ (9 individuos por grupo). B) Las barras muestran la media del porcentaje de células T CD31$^{+/-}$IFN-γ$^+$ o SLAM$^{+/-}$IFN-γ$^+$ relativos al total de linfocitos IFN-γ$^+$ luego de estimulación con *M.tb,* *p< 0.05 porcentaje de células T IFN-γ$^+$SLAM$^+$ o células T IFN-γ$^+$CD31$^+$ inducidas por *M.tb* contra el porcentaje de células T IFN-γ$^+$SLAM$^-$ o IFN-γ$^+$CD31$^-$. Wilcoxon Rank Sum test. C) Las barras representan el porcentaje de células T SLAM$^+$ luego de la estimulación con *M.tb* en presencia de α-CD31/isotipo relativas a las células T SLAM$^+$ luego de la estimulación con *M.tb* (8 individuos analizados).*p< 0.05, Wilconxon Rank Sum.

pacientes con una baja respuesta al patógeno, menos del 20% de las células T CD31$^-$ fueron SLAM$^+$ (Figura 4A). Más aún, en pacientes respondedores, tanto las poblaciones de linfocitos T IFN-γ$^+$CD31$^-$ como IFN-γ$^+$SLAM$^+$ representaron mas del 80% del total de las células T IFN-γ$^+$ (Figura 4B), denotando que la mayoría de las células T productoras de IFN-γ en respuesta al antígeno son SLAM$^+$CD31$^-$. Además, la señalización a través de CD31 disminuyó a más del 50% los niveles de expresión de SLAM en linfocitos T de pacientes respondedores (Figura 4C), indicando que CD31

estaría involucrado en la regulación de la activación de los linfocitos Th1 durante la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*.

Interacción de CD31 con SAP, una molécula de señalización que modula la producción de IFN-γ contra *M. tuberculosis*.

A continuación, investigamos si CD31 y SAP podrían participar en la regulación de las vías de señalización que controlan la secreción de IFN-γ en tuberculosis por una asociación directa como fue sugerido previamente (160). Así, inicialmente analizamos la expresión de CD31 y de SAP en pacientes con tuberculosis y en dadores sanos a diferentes tiempos. Los resultados mostraron un patrón similar de expresión de ambas proteínas en los tres grupos estudiados, tanto en niveles basales como a los 15 minutos de estimulación con *M.tb* (Figura 5A, Figura 6A). Sin embargo, a los 5 días de estimulación antigénica, observamos una marcada disminución de la expresión de CD31 y de SAP tanto en pacientes respondedores como en dadores sanos (Figura 5A, Figura 6A), mientras que se detectó un aumento de ambas proteínas en aquellos pacientes con una débil respuesta al antígeno (Figura 6A). Por otro lado, cuando analizamos los niveles basales de expresión de SAP en los linfocitos T $CD31^-$ y $CD31^+$ de dadores sanos, encontramos altos niveles constitutivos de SAP en la fracción de células T $CD31^+$ y una marcada disminución de la expresión de la proteína en la fracción $CD31^-$ (Figura 5B). Más aún, cuando CMSP de dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* durante 15 minutos, inmunoprecipitadas con SAP o CD31 y reveladas con anti-CD31 y anti-SAP respectivamente, observamos que ambas proteínas co-precipitaban, tanto en las células estimuladas con

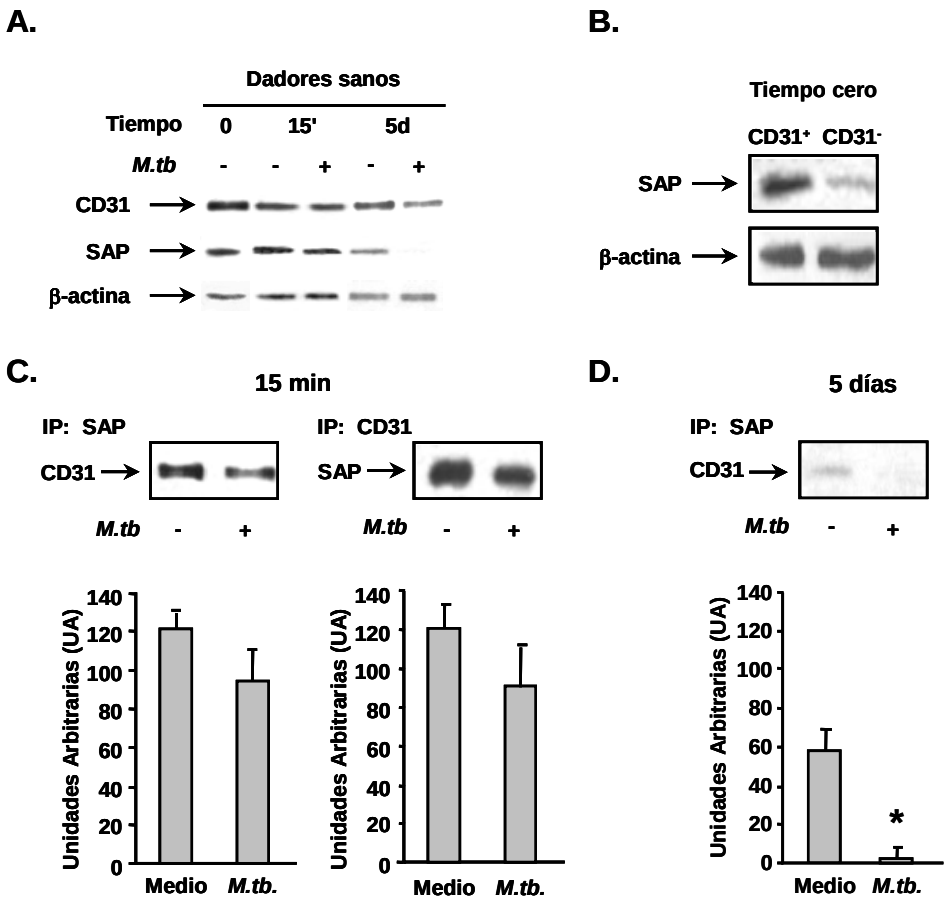

Figura 5. *Análisis de la asociación entre CD31 y SAP en dadores sanos luego de la estimulación con Mycobacterium tuberculosis.* A) Análisis de la expresión de las proteínas SAP, CD31 y β-actina por Western Blot. CMSP de dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* a diferentes tiempos y se determinó la expresion de las proteinas por Western Blot en los extractos celulares. Se muestra un dador sano representativo (9 individuos analizados). B) Análisis de la expresión basal de SAP y de β-actina en las sub-poblaciones $CD31^+$ y $CD31^-$. Se muestra un ejemplo representativo (de un total de 6 analizados). C) Análisis de la expresión de CD31 y de SAP por Western Blot luego de inmunoprecipitación con SAP y CD31, respectivamente. CMSP de dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* durante 15 minutos y luego inmunoprecipitadas con SAP o CD31. Se muestra un dador sano representativo (de un total de 8 analizados). D) Análisis de la expresión de CD31 Western Blot luego de la inmunoprecipitación con SAP. CMSP de dadores sanos fueron estimuladas por 5 días, luego inmunoprecipitados con CD31. Se muestra un dador sano representativo (de un total de 8 analizados). C-D) Los geles de poliacrilamida fueron escaneados y densitometrados y los resultados se expresaron como Unidades Arbitrarias (UA). Cada barra representa la media ± SEM de los valores de UA. *p< 0.001, Wilconxon Rank Sum.

antígeno como en aquellas células no estimuladas (Figura 5C). Resultados

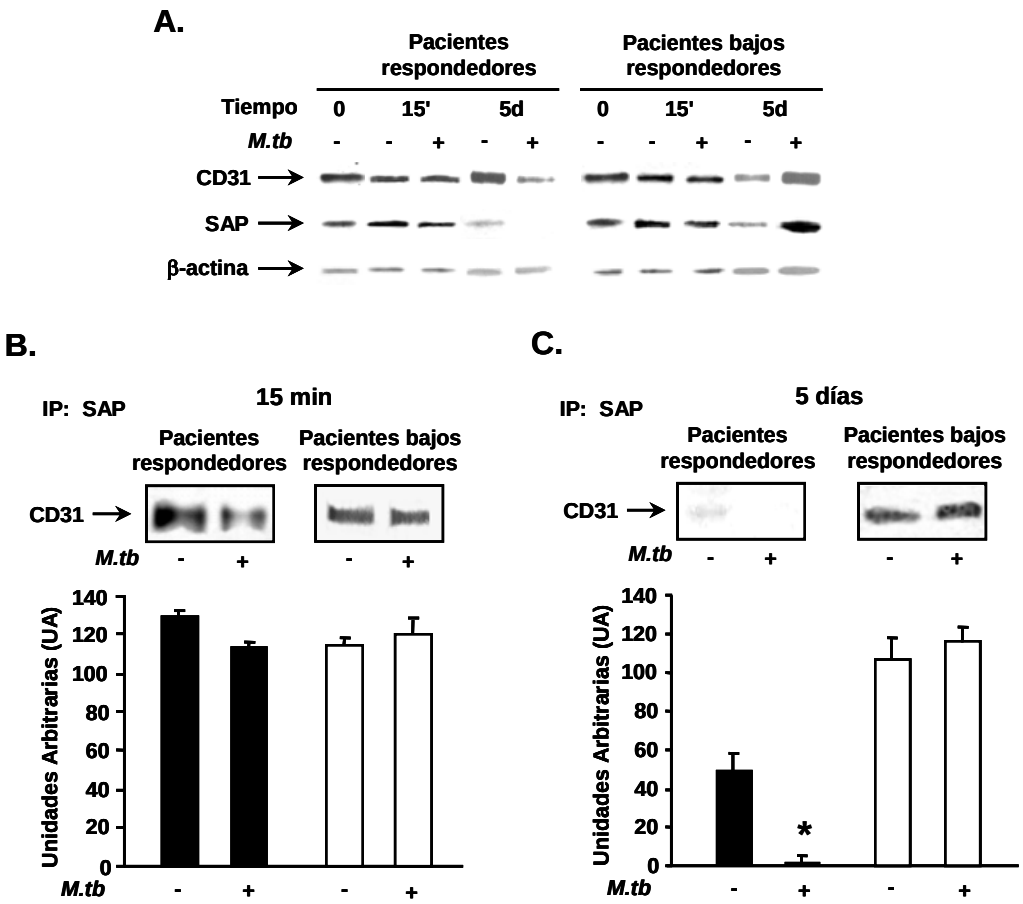

Figura 6. *Análisis de la asociación entre CD31 y SAP en pacientes con tuberculosis luego de la estimulación con M.tb.* A) Análisis de la expresión de las proteínas SAP, CD31 y β-actina por Western Blot. CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* a diferentes tiempos y se determinó la expresión de las proteínas por Western Blot en los extractos celulares. Se muestra un paciente representativo de cada grupo (9 individuos por grupo). B) Análisis de la expresión de CD31 por Western Blot luego de inmunoprecipitación. CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* durante 15 minutos y luego inmunoprecipitadas con SAP. Se muestra un paciente representativo de cada grupo (9 individuos por grupo). C) Análisis de la expresión de CD31 por Western Blot luego de inmunoprecipitación. CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* durante 5 días y luego inmunoprecipitadas con SAP. Se muestra un paciente representativo de cada grupo (9 individuos por grupo). B-C), los geles de poliacrilamida fueron escaneados y densitometrados y los resultados se expresaron como Unidades Arbitrarias (UA). Cada barra representa la media ± SEM de los valores de UA. * $P < 0.001$, Wilconxon Rank Sum.

similares fueron observados en los pacientes con tuberculosis (Figura 6B), lo que demuestra una asociación directa entre las dos proteínas inhibitorias durante las primeras etapas de la estimulación. Sin embargo, en los individuos que responden al antígeno, no se observó interacción luego de 5

días de estimulación con *M.tb* (Figura 5D, Figura 6C). En contraste, el incremento en los niveles de CD31 y de SAP en los pacientes de baja respuesta muestra una clara asociación entre estas moléculas luego de los 5 días de estimulación con el antígeno (Figura 6C). Por lo tanto, estos resultados sugieren que CD31 y SAP podrían participar en la regulación de las funciones efectoras de las células T en tuberculosis.

Efecto de la señalización de CD31 sobre la producción de IFN-γ luego de la estimulación con *M. tuberculosis.*

A fin de profundizar el estudio del rol de CD31 y de SAP sobre las vías de señalización que llevan a la producción de IFN-γ contra un patógeno intracelular humano, investigamos el efecto de la señalización de CD31 en células T activadas con *M.tb*. Para ello, CMSP de pacientes respondedores y dadores sanos fueron estimuladas durante 5 días con el sonicado de *M. tuberculosis*. A continuación las células fueron lavadas y nuevamente cultivadas en presencia/ausencia del anticuerpo agonista para CD31. Como se puede observar en la Figura 7, en estas condiciones la señalización a través de CD31 fue incapaz de disminuir los niveles de IFN-γ. Así, aunque las células T expresan niveles residuales de CD31 luego de la activación por *M.tb*, los linfocitos reactivos al antígeno no responden funcionalmente a la señalización a través de CD31.

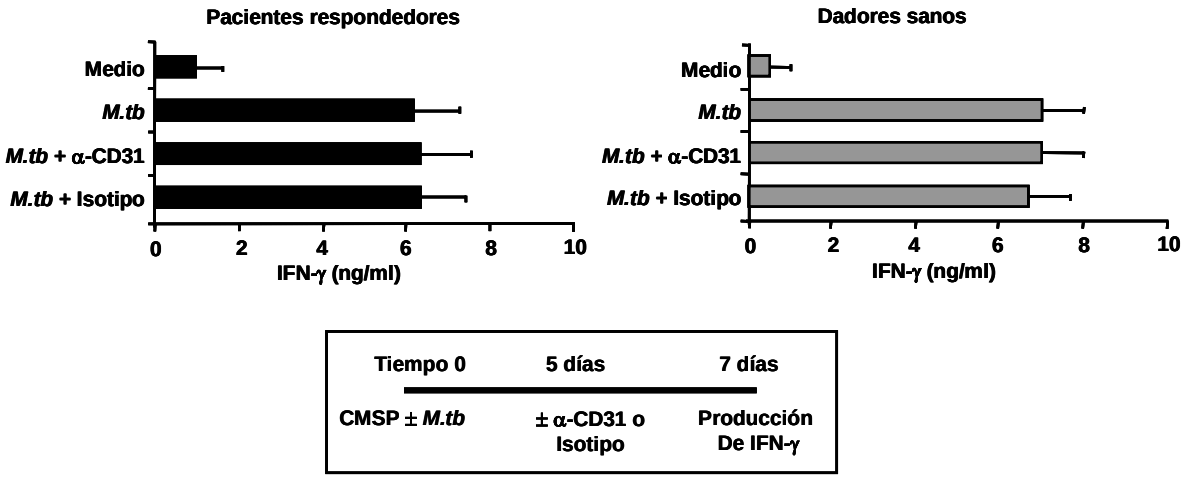

Figura 7. *Efecto de la señalización a través de CD31 sobre la producción de IFN-γ en células estimuladas con M.tb*. CMSP de pacientes con tuberculosis respondedores y dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* durante 5 días. Luego, las células fueron lavadas, cultivadas con anticuerpo α-CD31 o control de Isotipo por 48 horas y la producción de IFN-γ fue determinada por ELISA. Cada barra representa la media ± SEM de los valores de IFN-γ producidos por cada grupo (10 individuos por grupo).

Rol de CD31 en los individuos con el gen defectuoso de SAP (pacientes XLP).

Con el fin de confirmar que realmente la unión de CD31 a SAP interfiere con la producción de IFN-γ en respuesta a *M. tuberculosis*, se realizaron experimentos con células de pacientes XLP. Como se muestra en la figura 8A, se detectaron niveles similares de expresión de CD31 en la superficie de las células T de los pacientes XLP en comparación con los dadores sanos y pacientes respondedores (Figura 1A), tanto a tiempo cero (niveles basales) como después de la estimulación antigénica. Más aún, y como era de esperar, cuando las CMSP de pacientes XLP fueron estimuladas con *M.tb* durante 15 minutos y co-inmunoprecipitadas con CD31, no se observó inmunoprecipitación con SAP (datos no mostrados).

Interesantemente, el cultivo de CMSP de los pacientes XLP estimuladas con *M.tb* en conjunto con el anticuerpo de CD31 no modificó la secreción de IFN-γ (Figura 8B), confirmando que la asociación de CD31 con SAP interfiere con la producción de IFN-γ. En conjunto estos resultados demuestran que CD31 inhibe la producción de IFN-γ inducida por *M.tb* por un mecanismo dependiente de SAP.

Estos resultados dieron origen a la publicación "*Cross-talk between CD31 and SAP during IFN-γ production against Mycobacterium tuberculosis*" (249).

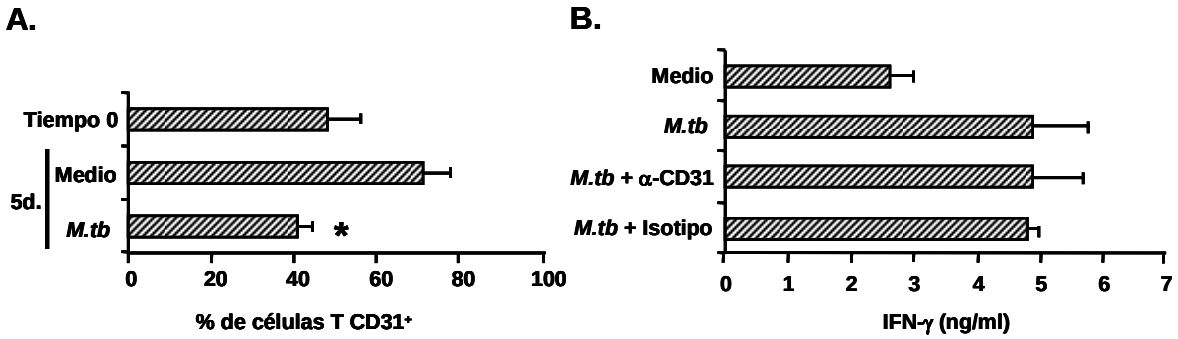

Figura 8. *Rol y expresión de CD31 en pacientes con el Síndrome Linfoproliferativo Asociado al Cromosoma X (XLP).* A) CMSP de pacientes XLP fueron estimuladas con *M.tb* durante 5 días, luego la expresión de CD31 fue analizada por citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células $CD3^+$. Cada barra representa la media del porcentaje de células T CD31+ ± SEM (6 experimentos). * $p < 0.05$. Wilcoxon Rank Sum test. B) CMSP de pacientes XLP fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpo anti-CD31 (α-CD31). Luego de 5 días, la producción de IFN-γ fue determinada por ELISA. Cada barra representa la media de la producción de IFN-γ ± SEM (6 experimentos).

Función de la vía de PD-1:PD-Ls sobre la regulación de las funciones efectoras de linfocitos T durante la tuberculosis.

M. tuberculosis **induce la expresión de PD-1 en la superficie de las células T.**

PD-1 es inducido y regulado luego de la activación a través del TCR (191, 250). Más aun, los niveles de expresión y el grado de unión de PD-1 con sus ligandos regulan el umbral de activación de las células T y los niveles de producción de citoquinas (251). Dado que la protección frente a *M. tuberculosis* requiere de la activación de las células T y la producción de IFN-γ (50, 252, 253), en este trabajo investigamos la expresión de PD-1 inducida por el sonicado de *M. tuberculosis* en células T de pacientes con tuberculosis activa y dadores sanos. Como ya había sido demostrado en células T humanas (254), observamos bajos niveles basales de PD-1 en linfocitos T en los tres grupos estudiados (Figura 9A). Sin embargo, la estimulación de CMSP con *M.tb* indujo un incremento significativo de PD-1 en la superficie de las células T $CD3^+$ de aquellos individuos respondedores (pacientes con tuberculosis respondedores y dadores sanos) (Figura 9B). Más aún, la expresión de PD-1 se incrementó tanto en la población de linfocitos T $CD3^+CD4^+$ como en la $CD3^+CD8^+$ de pacientes respondedores y dadores sanos (Figura 9C y datos no mostrados). En contraste, en los pacientes con una débil respuesta al antígeno, no se observaron diferencias

significativas en la expresión de PD-1 en la población de células T $CD3^+$ ni en las subpoblaciones $CD4^+$ y $CD8^+$ luego de la estimulación antigénica (Figura 9B, Figura 9C).

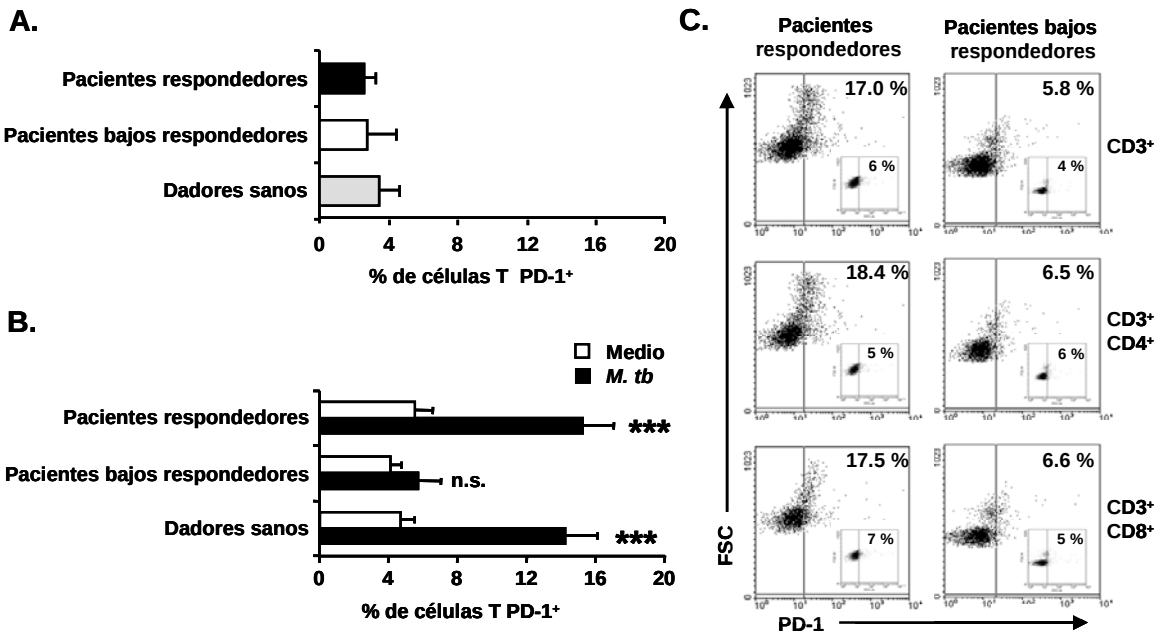

Figura 9. *Expresión de PD-1 en células T de pacientes con tuberculosis y dadores sanos.* A-B) La expresión de PD-1 en CMSP de pacientes con tuberculosis y de dadores sanos fue determinada por citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células $CD3^+$. A. Expresión basal de PD-1. B) Expresión de PD-1 en respuesta a 5 días de estimulación con *M.tb*. A-B) Cada barra representa el valor de la media ± SEM para cada grupo (14 individuos por grupo). ***$p<0.0001$ Wilcoxon Rank Sum test. C) CMSP fueron estimuladas con el antígeno durante 5 días y la expresión de PD-1 fue analizada en las células $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ o $CD3^+CD8^+$ mediante citometría de flujo. Se muestran dot plots representativo de cada grupo (11 individuos por grupo). En el inserto se muestra la expresión de PD-1 en las células cultivadas sólo con medio.

La expresión de PD-1 se encuentra asociada a la producción de IFN-γ inducida por *M. tuberculosis*.

Teniendo en cuenta que los pacientes respondedores secretan IL-10 pero producen altos niveles de IFN-γ frente a *M. tuberculosis* (130), mientras que los pacientes bajos respondedores inducen IL-10 pero bajos

niveles de IFN-γ, y considerando la regulación diferencial de la expresión de PD-1 en CMSP de pacientes frente al antígeno, nos preguntamos si la expresión PD-1 podría estar asociada con el microambiente de citoquinas producido en respuesta al patógeno. Por lo tanto, se investigó la asociación de la expresión de PD-1 y la producción de IFN-γ en pacientes con tuberculosis activa. Los resultados obtenidos mostraron la existencia de una correlación positiva significativa entre ambos parámetros (coeficiente de Spearman, $r = 0,5807$, $p < 0,0001$, Figura 10A). Estos datos demuestran que la expresión de PD-1 en pacientes con tuberculosis está asociada a la capacidad de las CMSP de producir IFN-γ y que PD-1 se encuentra mayormente expresado en aquellos pacientes con una fuerte inmunidad mediada por células frente al patógeno. Para profundizar la relación entre PD-1 y la producción de IFN-γ durante la infección activa por *M.tb*, determinamos la co-expresión de PD-1 y de IFN-γ por citometría de flujo luego de la estimulación con el antígeno. Observamos que la mayoría (95%) de las células T productoras de IFN-γ expresaban PD-1 (Figura 10B), lo cual sugiere que esta molécula co-estimulatoria podría estar regulada por citoquinas Th1.

A fin de confirmar que la expresión PD-1 era regulada por el IFN-γ, CMSP de pacientes respondedores fueron estimuladas con *M.tb* en presencia/ausencia de un anticuerpo neutralizante anti-IFN-γ. Como se muestra en la Figura 10C, el tratamiento con anti-IFN-γ redujo significativamente los niveles de PD-1 inducidos en respuesta al antígeno. A continuación examinamos si la expresión PD-1 podría incrementarse en pacientes bajos respondedores por adición de rIFN-γ. Cuando agregamos sólo IFN-γ, la expresión de PD-1 no se modificó (datos no mostrados). Sin

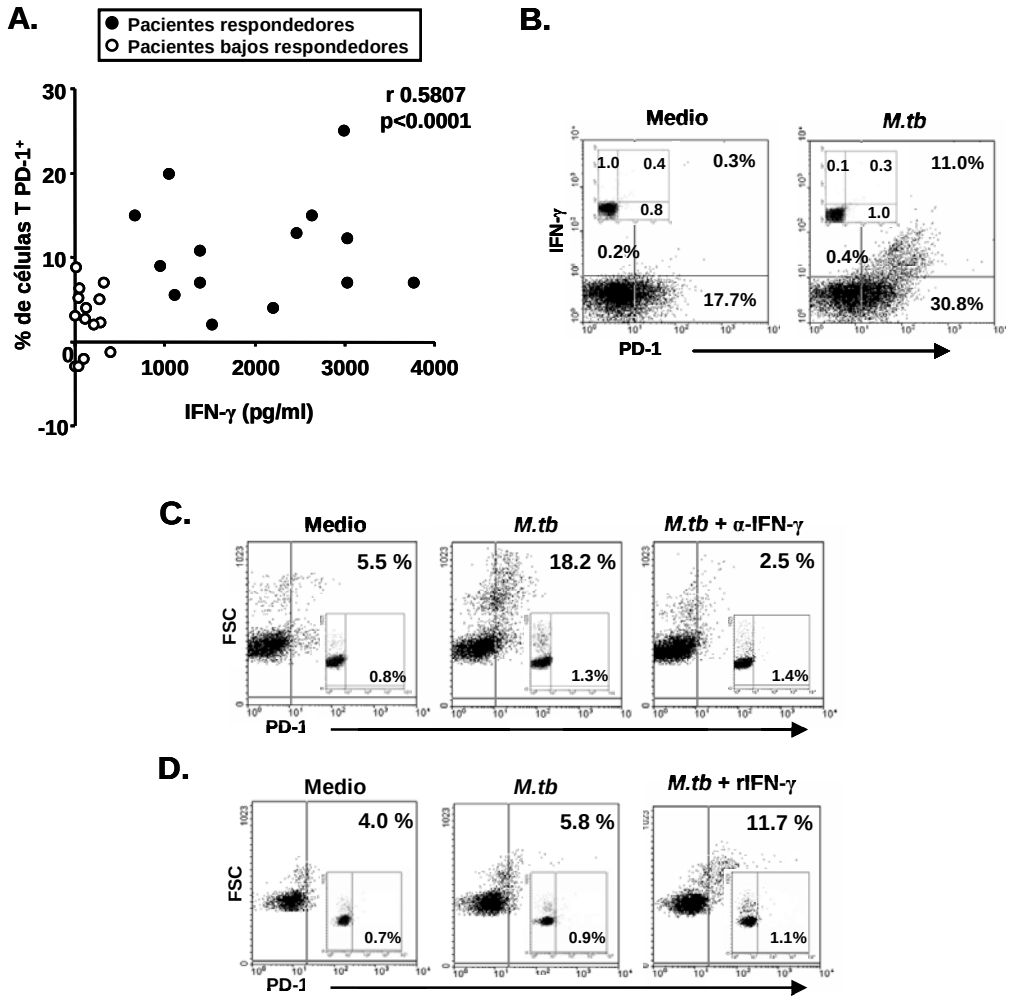

Figura 10. *Correlación entre PD-1 e IFN-γ en pacientes con tuberculosis activa.* A) CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas durante 5 días con *M.tb*, luego se analizó la expresión de PD-1 y la producción de IFN-γ por citometría de flujo y por ELISA, respectivamente. Cada símbolo representa el porcentaje de células T PD-1$^+$ versus la producción de IFN-γ para cada paciente analizado. Coeficiente de Spearman, r= 0.5807; p< 0.0001. B) CMSP de pacientes con tuberculosis respondedores fueron estimuladas con *M.tb* durante 4 días y la co-expresión de PD-1 e IFN-γ en células T fue analizada por citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células CD3$^+$. Se muestra un paciente representativo de 6 analizados. En el inserto se muestran los controles de isotipo. C-D) CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M. tb* durante 5 días en presencia o ausencia de α-IFN-γ (C) o de rIFN-γ (D), y la expresión de PD-1 fue determinada por citometría de flujo como se describió previamente. Se muestra un ejemplo representativo de pacientes respondedores (C) y bajos respondedores (D) de cada grupo (6 individuos por grupo). En el inserto se muestran los controles de isotipo.

embargo, cuando las células fueron estimuladas con *M.tb*, el IFN-γ exógeno produjo un aumento significativo de la expresión de PD-1 en las células T de

pacientes con débil respuesta al antígeno en comparación con las células estimuladas con *M.tb* (Figura 10D). Como era de esperar, el tratamiento con rIFN-γ también aumentó la expresión de PD-1 en las células provenientes de pacientes respondedores y dadores sanos (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados sugerirían que el IFN-γ inducido por *M. tuberculosis* regularía positivamente la expresión de PD-1, generando así un sistema de retroalimentación negativa.

M. tuberculosis **induce la expresión de PD-1 en los linfocitos T del sitio de infección.**

Los fluidos pleurales tuberculosos se caracterizan por un predominio de linfocitos T (255). Con la finalidad de investigar la relación entre PD-1 e IFN-γ en una muestra representativa del sitio de infección, se evaluaron los niveles de PD-1 e IFN-γ en fluido pleurales de pacientes con enfermedad activa. Así, observamos que en las CMFP *M.tb* indujo un aumento significativo de la expresión de PD-1 y de la secreción de IFN-γ en ambos grupos de pacientes (Figura 11A), y que este aumento resultó marcadamente superior al observado en CMSP (Figura 11B). Más aún, en contraste a lo observado en CMSP donde sólo los pacientes respondedores indujeron un aumento significativo de PD-1 e IFN-γ luego de la estimulación antigénica (Figura 10A, Figura 11B), en CMFP, la estimulación antigénica produjo incremento en los niveles de ambas moléculas tanto en los pacientes respondedores como en los de baja respuesta (Figura 11A). No obstante, los valores observados en los pacientes de baja respuesta fueron

significativamente más bajos que en los pacientes respondedores ($p < 0.001$, Mann Whitney).

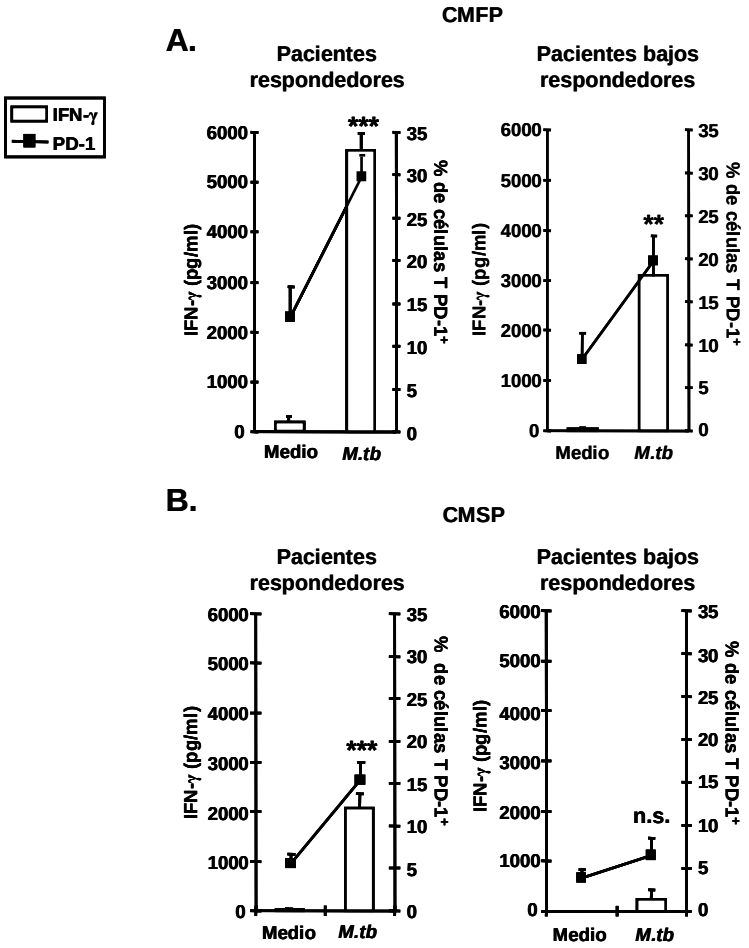

Figura 11. *Expresión de PD-1 e IFN-γ en Fluidos Pleurales de pacientes con tuberculosis.* A) CMFP y B) CMSP de pacientes con tuberculosis fueron cultivadas en presencia o ausencia de *M. tb*. Luego de 48 horas se cuantificó la producción de IFN-γ y luego de 5 días de cultivo, se analizó la expresión de PD-1 en células T $CD3^+$ por ELISA y citometría de flujo, respectivamente. Los datos muestran los valores de la media ± SEM de la producción de IFN-γ y de la expresión de PD-1 para cada grupo (A: 8 individuos por grupo; B: 14 individuos por grupo). $^{**}p < 0.001$; $^{***}p < 0.0001$; n.s: no significativo. Wilcoxon Rank Sum test.

Así, las CMFP de pacientes bajos respondedores expresan niveles inferiores de PD-1 y de IFN-γ en comparación con los pacientes respondedores. Estos resultados en conjunto con nuestros datos mostrando que el anti-IFN-γ bloquea la habilidad del antígeno para inducir PD-1, confirman que el

incremento de la expresión de PD-1 en células T de pacientes con tuberculosis en respuesta a *M.tb* estaría mediada por el IFN-γ.

La activación antigénica de las células T de pacientes con tuberculosis induce la expresión de los ligandos de PD-1.

Ambos ligandos de PD-1 (PD-Ls), PD-L1 y PD-L2, han sido implicados en la regulación de las funciones de las células T efectoras (256). Por otra parte, ha sido demostrado que PD-L1 y PD-L2 podrían tener diferentes funciones en la regulación de respuestas de las citoquinas de tipo 1 y tipo 2 (256). Por lo tanto, seguidamente estudiamos la participación de los ligandos de PD-1 en la activación de las células T en tuberculosis activa. Para ello, analizamos la expresión de los PD-Ls en CMSP de pacientes con tuberculosis. En forma similar a nuestros resultados sobre PD-1, detectamos una mínima expresión de PD-L1 y PD-L2 en células T en reposo (Figura 12A). Más aún, la estimulación con *M.tb* incrementó significativamente los niveles de PD-L1 y PD-L2 en las células T de ambos grupos de pacientes, aunque con niveles marcadamente más altos en los pacientes respondedores en comparación con aquellos con una débil respuesta al antígeno (Figura 12B). Además, si bien había sido descrito que la expresión de PD-L2 se encontraba limitada a los macrófagos y células dendríticas (200), nuestros resultados mostraron que *M.tb* inducía niveles significativos de este ligando en las células T de pacientes con tuberculosis (Figura 12B). Por otra parte, se determinaron los niveles de PD-L1 y de PD-L2 en las células T de los fluidos pleurales. Nuestros hallazgos mostraron

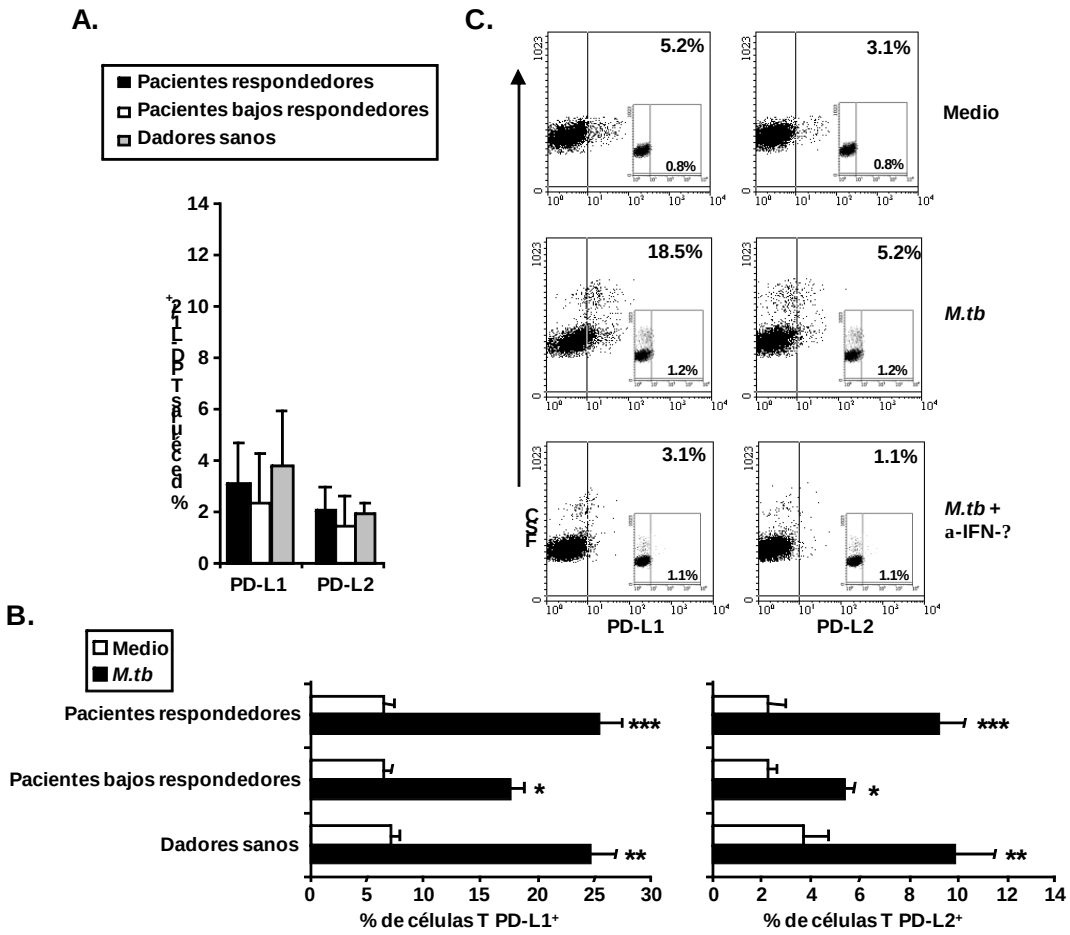

Figura 12. *Expresión de los ligandos de PD-1 en células de pacientes con tuberculosis activa y dadores sanos*. La expresión de PD-L1 y PD-L2 en CMSP de pacientes con tuberculosis y de dadores sanos fue determinada por citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células $CD3^+$. A) Expresión basal de PD-L1 y PD-L2. B) Expresión de PD-L1 y PD-L2 en respuesta a 5 días de estimulación con *M.tb*. A-B) Cada barra representa el valor de la media ± SEM del porcentaje de células T $PD\text{-}L1^+$ o $PD\text{-}L2^+$ (14 individuos por grupo). *p< 0.01; **p< 0.001; ***p< 0.0001, Wilcoxon Rank Sum test. C) CMSP de pacientes bajo respondedores fueron estimuladas con *M.tb* durante 5 días en presencia o ausencia de a-IFN-?. Luego la expresión de PD-L1 y de PD-L2 fue determinada en células T $CD3^+$ por citometría de flujo como se describió previamente. Se muestra un ejemplo representativo de 6 pacientes analizados. En el inserto se muestran los controles de isotipo.

que el antígeno promueve el aumento de los niveles de los ligandos y nuevamente en mayor grado que en las CMSP (**PD-L1**: pacientes respondedores; medio 19.1±4.4 *M.tb* 49.1±6.1, pacientes bajos respondedores; medio 12.8±4.1, *M.tb* 38.2±6.3. **PD-L2**: pacientes respondedores; medio 5.9±2.1 *M.tb* 15.8±3.2, pacientes bajos respondedores; medio 3.9±1.9, *M.tb* 9.3±4.1). Más aun, los niveles de

ambos PD-Ls inducidos en respuesta al sonicado de *M. tuberculosis* fueron marcadamente inhibidos por el agregado de anti-IFN-γ en todos los grupos estudiados, un efecto que incluso se observa en las CMSP de pacientes de baja respuesta (Figura 12C) individuos que si bien producen muy bajos niveles de IFN-γ en respuesta a *M.tb*, los mismos serían suficientes para inducir niveles significativos de los ligandos de PD-1 y no así del receptor. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el IFN-γ endógeno inducido por *M.tb* participa en la regulación de la expresión de los PD-Ls.

La interacción PD-1:PD-Ls regula las funciones efectoras de las células T en tuberculosis.

Los datos mostrados hasta aquí demuestran que el IFN-γ inducido por *M. tuberculosis* modula los niveles de PD-1 y de sus ligandos en pacientes con tuberculosis activa. A continuación, investigamos si la señalización a través de la vía de PD-1:PD-Ls participaría en la regulación de las funciones efectoras de las células T durante la enfermedad activa. Inicialmente analizamos el rol de la interacción PD-1:PD-Ls en la degranulación lítica específica de las células T CD8 contra *M. tuberculosis*. Para ello, CMSP o CMFP de pacientes con tuberculosis fueron incubadas en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y anti-PD-L2, y finalmente estimuladas con *M.tb*. Luego de 24 h, se determinó la degranulación lítica de los linfocitos T CD8 mediante el análisis de la expresión de las moléculas CD107a/b, como se describe en *Materiales y Métodos*. Observamos que en las CMSP, la estimulación con el antígeno, al

igual que ocurre con la producción de IFN-γ, sólo induce la degranulación de los linfocitos T CD8 en los pacientes respondedores (Figura 13A, panel izquierdo). Más aún, y nuevamente en similitud a lo observado para el IFN-γ, en CMFP la degranulación lítica fue inducida en ambos grupos de pacientes. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en sangre periférica, no se detectaron diferencias apreciables entre los pacientes respondedores y los de baja respuesta (Figura 13A, panel derecho). Interesantemente, el bloqueo de PD-1 indujo un incremento significativo en el porcentaje de células T $CD3^+CD8^+$ que expresaron CD107a/b en todos los grupos estudiados excepto en las CMSP provenientes de pacientes bajos respondedores (Figura 13A). Estos datos sugieren que PD-1 podría estar implicado en la degranulación lítica contra el patógeno. Existen amplias evidencias que sugieren que ambos ligandos de PD-1 se unen a un segundo y aún no identificado receptor (257). Más aún, recientemente se ha descrito que PD-L1 interacciona específicamente con B7-1 en ratón (258). Sin embargo, hasta la fecha, sólo PD-1 ha sido reportado como el receptor de PD-L1 y PD-L2 en humanos. Por lo tanto, para confirmar que la inhibición de la degranulación lítica en los linfocitos T $CD3^+CD8^+$ o ocurriría a través de la interacción de PD-1 con sus ligandos y no a través de la interacción de PD-L1 y/o PD-L2 al posible receptor desconocido, bloqueamos en forma total la vía de PD-1:PD-L1/PD-L2. Como se muestra en la figura 13A no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de células T $CD3^+CD8^+$ que expresaron CD107a/b ante el bloqueo simultáneo de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en ninguno de los grupos estudiados. Estos hallazgos sugerirían que la interacción de PD-1 con PD-L1 y PD-L2 inhibiría la degranulación de células T $CD8^+$ en pacientes con tuberculosis.

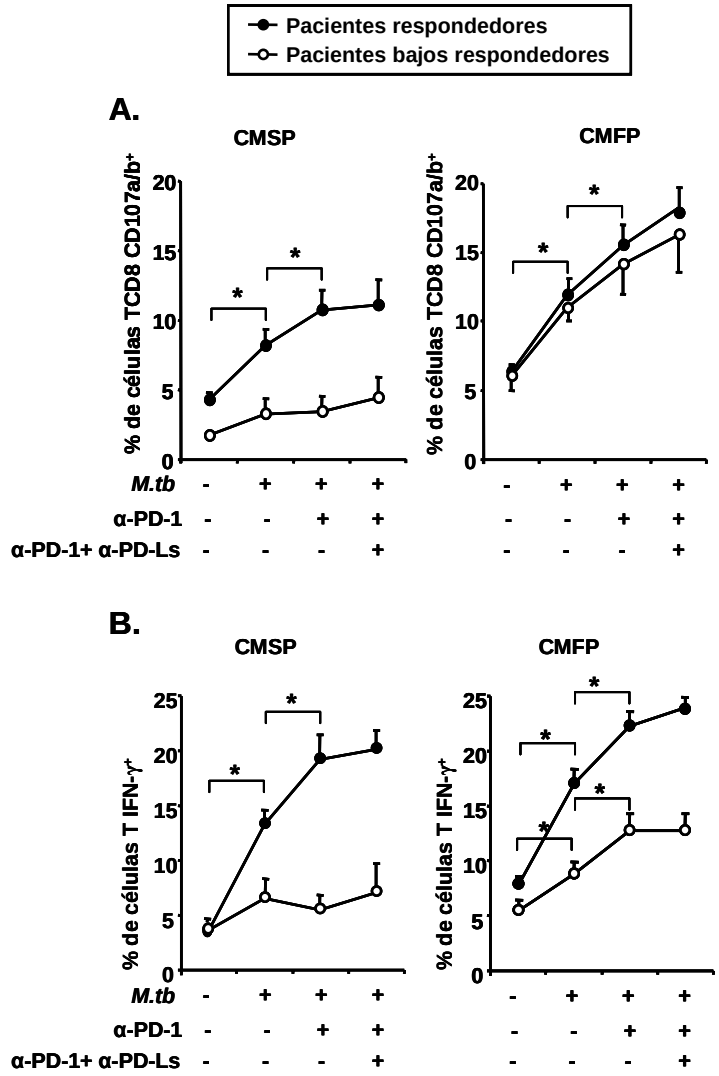

Figura 13. *Efecto de las interacciones entre PD-1:PD-Ls sobre las funciones efectoras de las células T en pacientes con tuberculosis*. CMSP o CMFP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti PD-1 y/o PD-L1 y PD-L2 (α-PD-1 y α-PD-Ls). A) Luego de 24 horas la expresión de CD107a y CD107b fue analizada mediante citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células $CD3^+CD8^+$. Cada punto representa la media ± SEM del porcentaje de células TCD8 $CD107a/b^+$ para cada grupo (CMSP: 11 pacientes por grupo; CMFP: 7 pacientes por grupo). *$p<0.01$. Wilcoxon Rank Sum test. B) Luego de 4 días se determinó la producción de IFN-γ intracelular por citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células $CD3^+$. Cada punto representa la media ± SEM del porcentaje de células T IFN-γ^+ para cada grupo (CMSP: 8 pacientes por grupo; CMFP: 6 pacientes por grupo). *$p<0.01$. Wilcoxon Rank Sum test.

Dado que la producción de IFN-γ por las células T es crucial en la respuesta inmune contra la infección por *M. tuberculosis*, el próximo

objetivo fue determinar si la vía de PD-1:PD-Ls se encontraba involucrada en la modulación de las vías de señalización que controlan la producción de IFN-γ en la tuberculosis activa. Así, analizamos el porcentaje de células T $CD3^+IFN\text{-}\gamma^+$ inducida por *M.tb* luego del bloqueo de PD-1 y/o de la vía completa. En CMSP los pacientes respondedores mostraron un incremento significativo del porcentaje de células T $CD3^+$ productoras de IFN-γ en presencia del antígeno y un incremento aún mayor al bloquear PD-1 (Figura 13B, panel izquierdo). Más aún, el bloqueo simultáneo de PD-1 y sus ligandos demostró que PD-1, a través de la interacción con PD-L1 y PD-L2, inhibe el porcentaje de células productoras de IFN-γ en los pacientes respondedores (Figura 13B, panel izquierdo). Sin embargo, el bloqueo de PD-1 o la vía completa no modificó la intensidad de florescencia media de las células T $CD3^+$ (datos no mostrados). Por lo tanto, este incremento observado en la secreción de IFN-γ por efecto del bloqueo de PD-1:PD-Ls se debió a un aumento en el número de células T que producen la citoquina (como se manifiesta en el porcentaje de linfocitos T $CD3^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$), pero no a un aumento de la producción de IFN-γ por cada célula a nivel individual. Por lo tanto, nuestros resultados indicarían que una mayor cantidad de células efectoras secretarían IFN-γ por efecto del bloqueo de la vía de PD-1. En contraste, resultados previos de nuestro grupo demostraron que el aumento en la producción de IFN-γ después de co-estimulación a través de ICOS es resultado de la mayor producción de IFN-γ por las células activadas (129, 130). De esta manera, observamos diferencias en el rol de las distintas vías co-estimuladoras de la producción de IFN-γ en tuberculosis.

En contraste a lo observado en los pacientes respondedores, en las CMSP de los pacientes con una débil respuesta al antígeno, el porcentaje de

células T productoras de IFN-γ no se modificó por bloqueo de PD-1 o de la vía completa (Figura 13B, panel izquierdo). Sin embargo, en el sitio de infección, en ambos grupos de pacientes se observó un aumento del

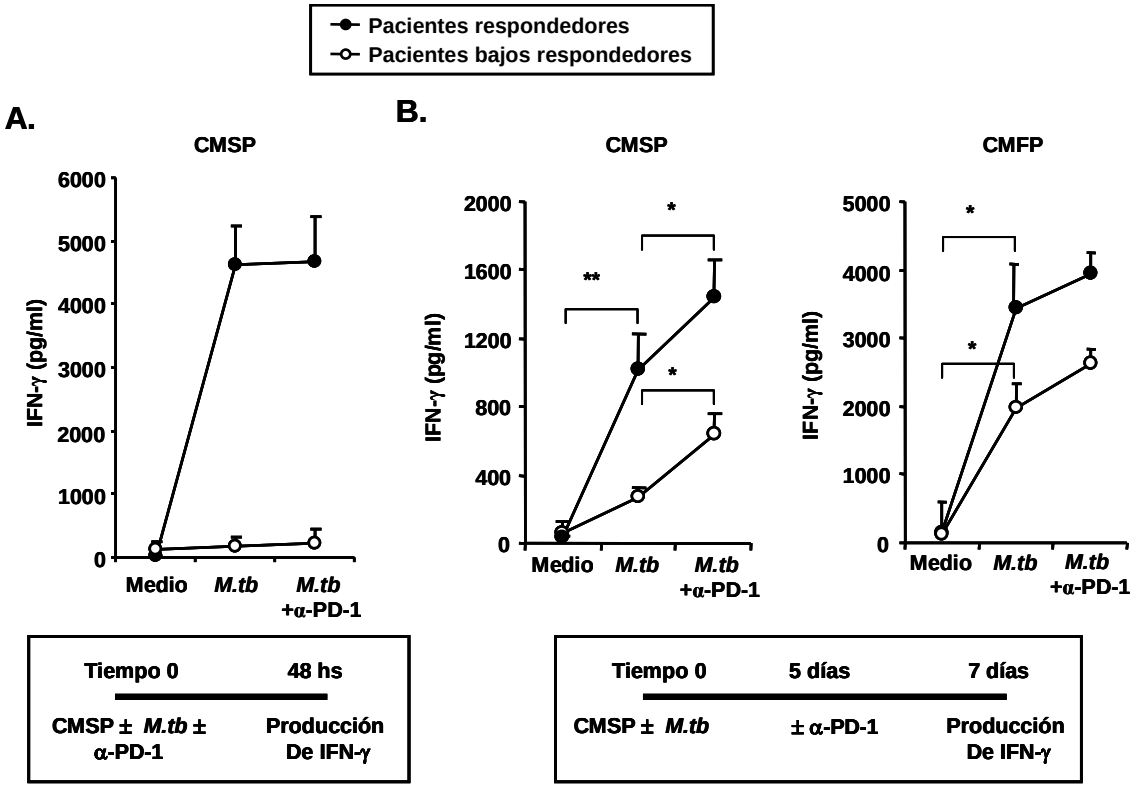

Figura 14. *Rol de la vía de señalización de PD-1 sobre la producción de IFN-γ en pacientes con tuberculosis activa*. A) CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de α-PD-1 durante 48 horas. Luego, se analizó la producción de IFN-γ por ELISA. B) CMSP o CMFP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* y luego de 5 días las células fueron lavadas y cultivadas en presencia o ausencia de α-PD-1 durante las siguientes 48 horas. Luego, se analizó la producción de IFN-γ por ELISA. A-B) Cada punto representa la media de la producción de IFN-γ ± SEM (CMSP: 11 pacientes por grupo; CMFP: 7 pacientes por grupo). *p< 0.01; **p< 0.001. Wilcoxon Rank Sum test.

porcentaje de células T $CD3^+IFN\text{-}\gamma^+$, aunque en mayor medida en los pacientes respondedores. Más aún, el bloqueo de PD-1 y de PD-1:PD-Ls incrementó aun más este porcentaje en ambos grupos de pacientes (Figura 13B, panel derecho).

Interesantemente, cuando se determinaron los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de estos cultivos provenientes de CMSP observamos

que el bloqueo de la vía de PD-1 no indujo un efecto significativo sobre la secreción de IFN-γ (Figura 14A). Seguidamente, investigamos el efecto del bloqueo de la vía de PD-1 en células previamente estimuladas con el antígeno. Para ello, CMSP y CMFP de los pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* y, después de 5 días, las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de anti-PD-1 y/o PD-Ls. Como se muestra en la figura 14B, el bloqueo de PD-1 aumentó significativamente la producción de IFN-γ inducida por *M.tb* en todos los grupos de pacientes con tuberculosis estudiados, incluso en células de sangre periférica de los pacientes de baja respuesta al antígeno. Sin embargo, el bloqueo de PD-1 no tuvo ningún efecto sobre la producción de IL-10 en los grupos estudiados (datos no mostrados). En conjunto, estos datos sugieren que PD-1 y sus ligandos participarían en la regulación de la respuesta inmune de tipo 1 contra *M. tuberculosis*.

Aumento de la producción de IFN-γ por el efecto simultaneo de PD-1 y SLAM luego de la estimulación con *M.tb*.

Ha sido propuesto que se requeriría de la cooperación entre las moléculas estimuladoras e inhibitorias para la coordinación de las respuestas de células T en la inmunidad o la tolerancia (257). Se sugirió que la inmunoterapia combinada podría mejorar las respuestas de células T en cáncer y en infecciones virales crónicas (259-261), ya sea a través de la co-estimulación doble con moléculas co-estimuladoras o mediante el bloqueo de un receptor inhibitorio y la activación de una molécula co-estimuladora (236). Para analizar esta posibilidad durante la infección

persistente por *M. tuberculosis*; se investigó si la cooperación entre vías estimuladoras e inhibitorias de IFN-γ podrían mejorar las respuestas frente a *M. tuberculosis*. Nuestros resultados demuestran que el bloqueo de PD-1 aumenta significativamente la producción de IFN-γ en células previamente activadas con *M.tb* en pacientes que responden débilmente al antígeno (Figura 14B), aunque a niveles inferiores a los secretados por los pacientas respondedores.

Previamente hemos demostrado que la co-estimulación a través de SLAM induce significativamente la secreción de IFN-γ en ambos grupos de pacientes, si bien, como en el caso de la señalización vía PD-1, los niveles de la citoquina producidos por los pacientes bajos respondedores no alcanzan a los producidos por los pacientes respondedores (129, 130). Así, seguidamente estudiamos si la cooperación entre SLAM y PD-1 podría ejercer efectos aditivos/sinérgicos o mostrar una dicotomía funcional en la modulación de las respuestas de las células T efectoras en tuberculosis, como ya ha sido descrito en otras patologías (259-261). Para ello, CMSP o CMFP de pacientes respondedores y bajos respondedores fueron estimuladas con el sonicado de *M. tuberculosis*. Luego de 5 días, las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de anti-SLAM, anti-PD-1 o anti-SLAM más anti-PD-1. Los sobrenadantes libres de células fueron obtenidos luego de 48hs y la producción de IFN-γ fue determinada por ELISA. Como se muestra en la figura 15A, y de acuerdo con nuestros resultados anteriores y actuales, el agregado de anti-SLAM o anti-PD-1 aumentó significativamente la producción de IFN-γ inducida por *M.tb* en las CMSP provenientes de ambos grupos de pacientes ((129) y Figura. 14B, respectivamente). El bloqueo de PD-1 en simultáneo con la activación de

SLAM incrementó aún más la secreción de IFN-γ en pacientes respondedores (Figura 15A, panel superior). Interesantemente, la adición simultánea de

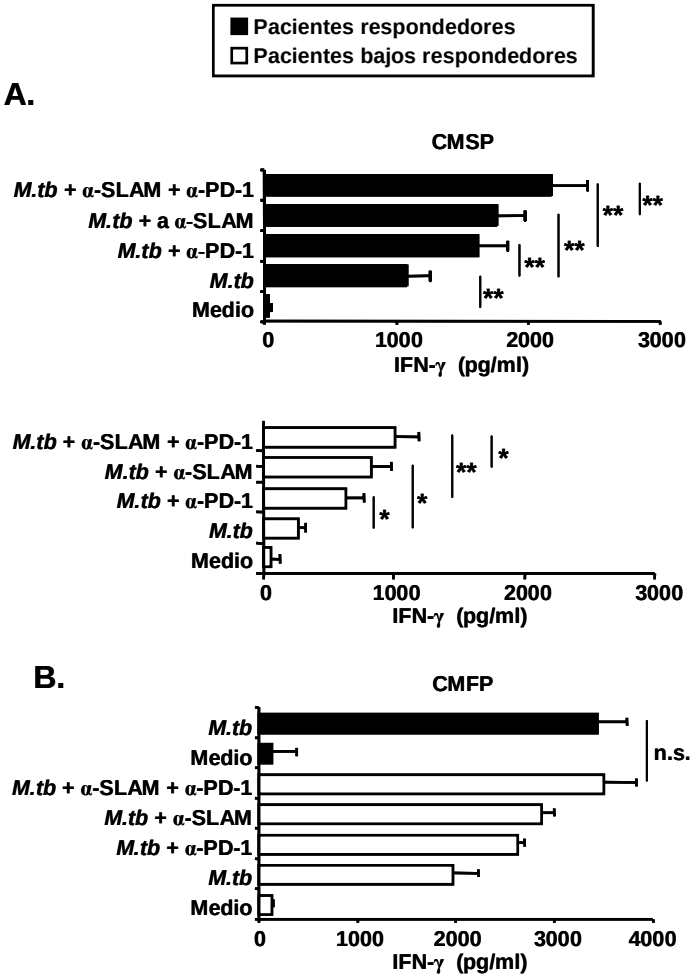

Figura 15. *Efecto del bloqueo de PD-1 y de la estimulación simultánea a través de SLAM sobre la producción de IFN-γ en pacientes con tuberculosis.* A) CMSP o B) CMFP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb*. Luego de 5 días las células fueron lavadas y cultivadas en presencia o ausencia de α-PD-1 ± α-SLAM durante las siguientes 48 horas. Luego, se analizó la producción de IFN-γ por ELISA. Cada punto representa la media de la producción de IFN-γ ± SEM (CMSP: 11 pacientes por grupo; CMFP: 6 pacientes por grupo). *p< 0.01; **p< 0.001; Wilcoxon Rank Sum test. n.s.: diferencias no significativas

ambos anticuerpos indujo un aumento significativo de la producción de IFN-γ en individuos con débil respuesta al antígeno, alcanzando en este caso niveles similares a los observados en los pacientes respondedores en respuesta a *M.tb* (Figura 15A, panel inferior). En el sitio de infección, donde la estimulación con el antígeno indujo alta expresión de PD-1 (Figura 11A) y

elevados niveles de SLAM (datos no mostrados) en ambos grupos de pacientes, la combinación de SLAM y PD-1 produjo el mismo comportamiento que en CMSP pero con mayores niveles de IFN-γ secretados (Figura 15B). En conjunto, nuestros datos indican que la co-estimulación a través de SLAM y el bloqueo de PD-1 cooperarían para producir un efecto sinérgico en la producción de IFN-γ frente al patógeno, incluso en los pacientes con tuberculosis que responden débilmente al sonicado de *M. tuberculosis*.

Estos resultados dieron origen a la publicación "PD-1:PD-L1/PD-L2 Pathway Inhibits T Cell Effector Functions during Human Tuberculosis" (262).

Regulación de las células Th17 a través de la vía de PD-1 en pacientes con tuberculosis.

M. tuberculosis induce la producción de IFN-γ e IL-17 en pacientes con enfermedad activa.

Las células Th17 juegan un rol crucial en la respuesta inflamatoria, pudiendo contribuir a la protección en infecciones (64). Recientemente, fue reportado por primera vez, que las células T $CD4^+$ productoras de IL-17 e IL-22 contribuyen a la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* en individuos expuestos al patógeno y en pacientes con tuberculosis (76). Asimismo, ha sido demostrado que las células Th17 poseen la capacidad de

expresar e incrementar en su superficie celular moléculas como CD2, moléculas co-estimulatorias (CD28, CTLA-4, PD-1 e ICOS), marcadores de activación y CD49d, indicando que las células Th17 estarían "equipadas" para participar en el reclutamiento a tejidos, activación y proliferación celular. Los mencionados trabajos de investigación muestran que las células Th17 constituirían una potente sub-población de células T efectoras. Sin embargo, aún quedan muchas preguntas sin responder sobre la función de este linaje celular en infecciones como la tuberculosis humana. Así, considerando la importancia del IFN-γ en infecciones bacterianas intracelulares y que la secreción de esta citoquina en tuberculosis puede ser regulada por moléculas como PD-1, en este trabajo investigamos el potencial rol regulatorio de PD-1 sobre las células productoras de IL-17 y la eventual participación de IFN-γ en dicha regulación. Para ello, estudiamos inicialmente la producción de IL-17 luego de la estimulación con *M.tb* en CMSP de pacientes con tuberculosis y dadores sanos. Como se observa en la figura 16, los niveles de IL-17 se incrementaron significativamente luego del estímulo antigénico en ambos grupos de individuos, pero significativamente en mayor grado en pacientes con tuberculosis ($p < 0.01$, test de Mann-Whitney). Estos resultados demuestran que en respuesta a *M.tb*, los pacientes con tuberculosis producen mayores niveles de IL-17 y menores de IFN-γ en comparación con los dadores sanos.

M. tuberculosis **induce la secreción de IL-17 por linfocitos Th17.**

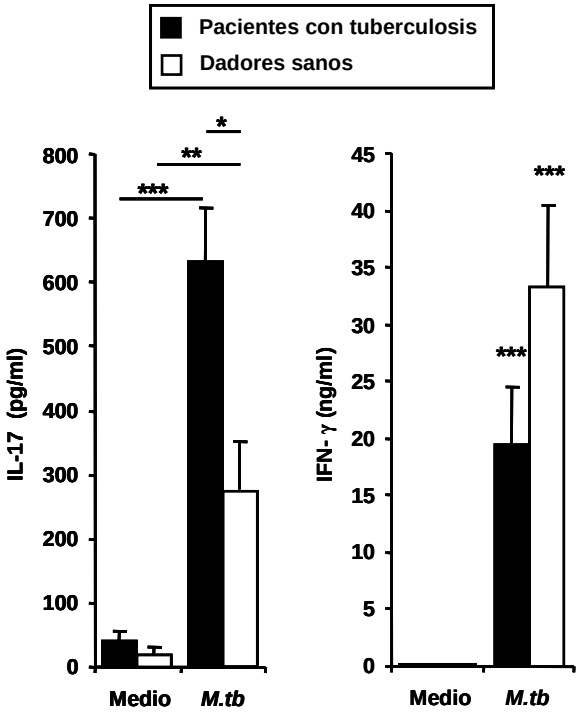

Figura 16. *Inducción de la producción de IL-17 e IFN-γ por M. tuberculosis.* CMSP de pacientes con tuberculosis y de dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* durante 5 días. Luego, se analizó la producción de IL-17 e IFN-γ por ELISA. Cada barra representa la media ± SEM de la producción de IL-17 o IFN-γ en cada grupo (14 individuos por grupo). *p< 0.01, Mann-Whitney; **p< 0.001, ***p< 0.0001, Wilcoxon Rank Sum test.

Ha sido demostrado que la IL-17 es secretada por distintos tipos celulares (68-73). Sin embargo, son las células $TCD4^+$ productoras de IL-17 las que han sido definidas como el linaje Th17 (74). Por lo tanto, seguidamente analizamos en pacientes con tuberculosis y dadores sanos el porcentaje de células TCD4 que secretaban IL-17 luego de estimulación antigénica. Observamos que *M.tb* indujo un incremento significativo de los niveles de células Th17 en ambos grupos de individuos (Pacientes con tuberculosis: medio 1.9±0.4; *M.tb* 10.8±1.1; DS: medio 2.1±0.5; *M.tb* 6.9±1.7), pero los porcentajes observados en pacientes fueron marcadamente superiores que en DS ($p< 0.01$, test de Mann-Whitney) (Figura 17). Así, los niveles de células $CD4^+IL\text{-}17^+$ detectados en los grupos de individuos estudiados mostraron una correlación con los niveles de IL-17

producidos por las CMSP en ambos grupos (Figura 16). Nuestros hallazgos indican entonces que la producción de IL-17 inducida por *M. tuberculosis* sería secretada, al menos parcialmente, por el linaje de células Th17.

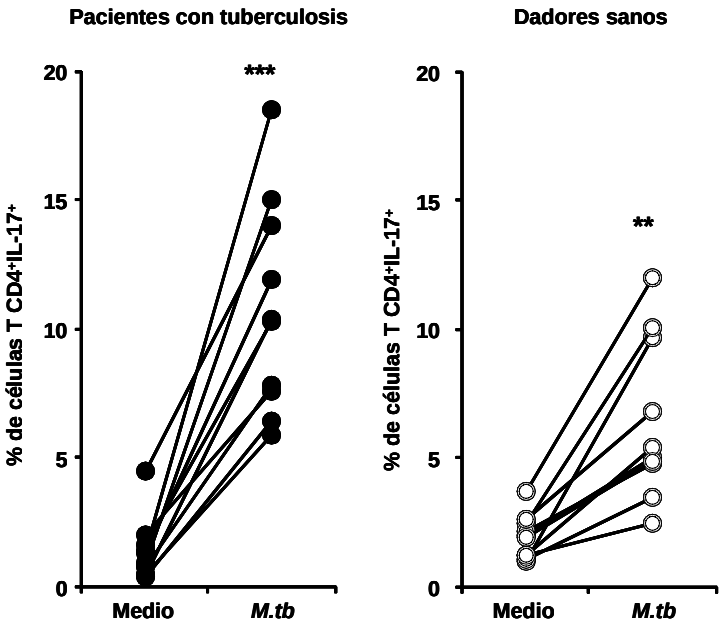

Figura 17. *Producción de IL-17 en las células Th17 de pacientes con tuberculosis y dadores sanos*. CMSP de pacientes con tuberculosis y de dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* durante 5 días. Luego, se analizó la producción intracelular de IL-17 mediante citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células $CD4^+$. Cada punto/línea representa el porcentaje de $IL\text{-}17^+$ en las células TCD4 de cada individuo analizado (9 individuos por grupo). $^{**}p<0.001$; $^{***}p<0.0001$. Wilcoxon Rank Sum test.

Co-expresión de PD-1 e IL-17 en las células Th17 en pacientes con tuberculosis.

Dado que fue reportado que los linfocitos Th17 expresan moléculas co-estimulatorias, y en particular, que una de ellas, PD-1 se ve

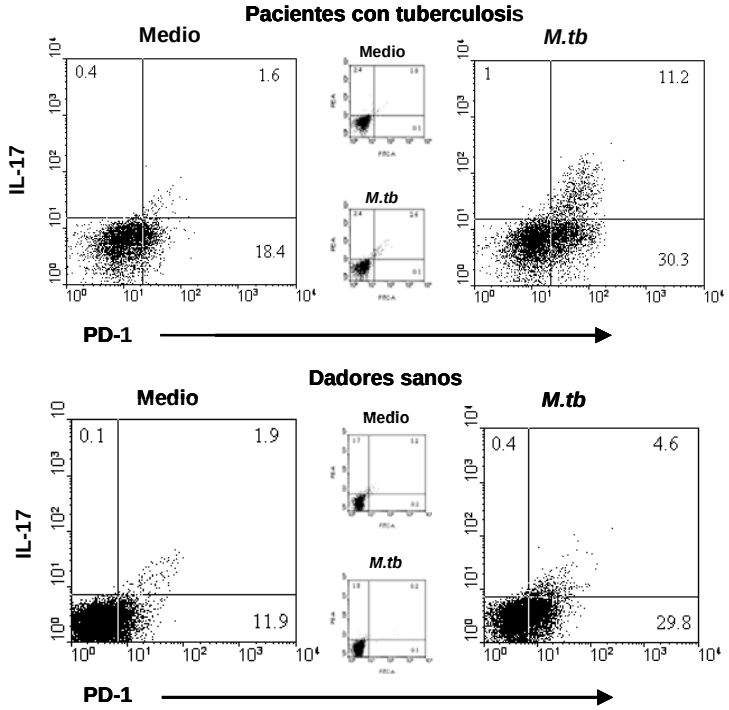

Figura 18. *Co-expresión de PD-1 e IL-17 en células TCD4 de pacientes con tuberculosis y dadores sanos*. CMSP de pacientes con tuberculosis y de dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* durante 5 días. Luego, se analizó la producción intracelular de IL-17 y la expresión de PD-1 mediante citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células $CD4^+$. Se muestra un ejemplo representativo de cada grupo analizado (8 individuos por grupo). En el inserto se muestran los controles de isotipo.

incrementada en la superficie de las céluals Th17 luego de la activación, nuestro siguiente objetivo fue investigar si *M.tb* inducía la expresión de PD-1 en este linaje. Para ello determinamos la co-expresión de PD-1 e IL-17 en las células TCD4 provenientes de pacientes con tuberculosis y dadores sanos luego de estimulación por 5 días con el antígeno. Es importante destacar aquí, que el clon del anticuerpo monoclonal anti-PD-1 utilizado para los experimentos que se describen a continuación, es diferente al utilizado en los experimentos previamente descriptos en esta tesis doctoral. El motivo del cambio de anticuerpo se debió a la aparición comercial del

reactivo directamente marcado con fluorocromo, el cual no existía al momento de realizarse los estudios antes descriptos. Sin embargo, previamente al inicio de las investigaciones que se detallan más abajo, se confirmaron con este nuevo clon los estudios previos publicados y se observó una correlación directa con ambos clones de anti-PD-1. Interesantemente, nuestros resultados mostraron que, tanto en pacientes con tuberculosis como en dadores sanos, más del 90% de los linfocitos TCD4 que expresaban IL-17, eran PD-1^{+} (Figura 18). Por lo tanto, *M. tuberculosis* indujo tanto la producción de IL-17 como la expresión de PD-1 en los linfocitos Th17 y, más aún, la mayoría de las células que secretaban IL-17 expresaban PD-1.

Rol de la vía de PD-1 sobre la producción de IL-17 en las células Th17.

M. tuberculosis indujo la producción de IL-17, la cual, por lo menos en parte, fue secretada por las células Th17, linaje que expresó casi en su totalidad, PD-1 en su superficie. A continuación, analizamos la función de la señalización a través de PD-1 sobre la producción de IL-17 luego de la estimulación antigénica. Para ello, CMSP de pacientes con tuberculosis y dadores sanos fueron incubadas con anticuerpo bloqueante anti-PD-1 y posteriormente estimuladas con el antígeno. Como se observa en la figura 19A, bajo este esquema de estimulación, no se detectaron cambios significativos en la producción de IL-17 en pacientes con tuberculosis. Sin embargo, cuando el bloqueo se realizó en células previamente activadas, observamos que la señalización a través de PD-1 incrementó

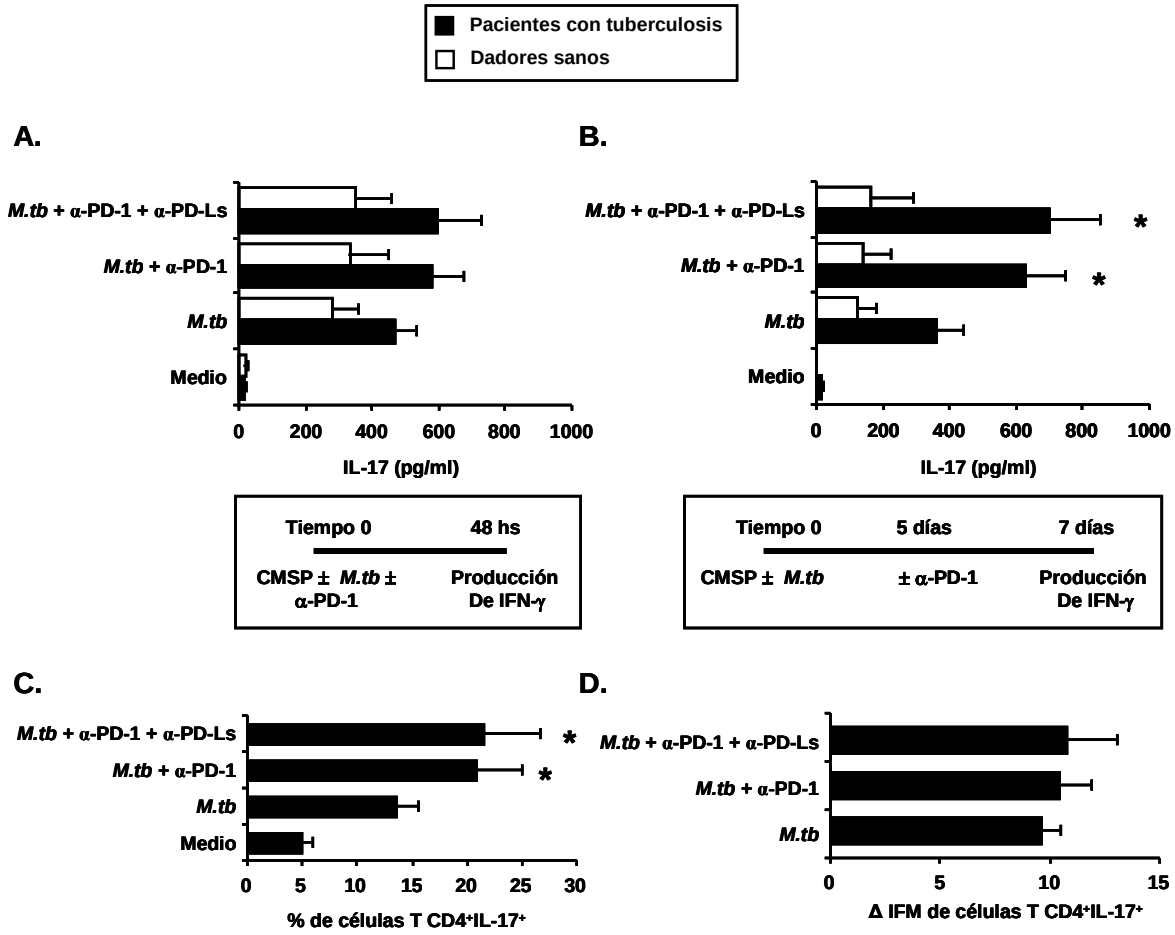

Figura 19. *Rol de la vía de PD-1:PD-Ls sobre la producción de IL-17 en pacientes con tuberculosis y dadores sanos*. A) CMSP de pacientes con tuberculosis y de dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de α-PD-1 ± α-PD-Ls durante 5 días. Luego, se analizó la producción de IL-17 por ELISA. B) CMSP de pacientes con tuberculosis y de dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* y luego de 5 días las células fueron lavadas y cultivadas en presencia o ausencia de α-PD-1 ± α-PD-Ls durante las siguientes 48 horas. Luego, se analizó la producción de IL-17 por ELISA. A-B) Cada barra representa la media de la producción de IL-17 ± SEM para cada grupo (10 individuos por grupo). *$p<0.01$. Wilcoxon Rank Sum test. C-D) CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de α-PD-1 ± α-PD-Ls. Luego de 5 días se analizó la producción intracelular de IL-17 por citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células $CD4^+$. C) Cada barra representa la media del porcentaje de células TCD4 $IL\text{-}17^+$ ± SEM (6 individuos por grupo). *$p<0.01$. Wilcoxon Rank Sum test. D) Cada barra representa la media del delta de la Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) ± SEM de la de las células TCD4 $IL\text{-}17^+$, calculado restando el valor de la IFM de las células TCD4 $IL\text{-}17^+$ cultivadas sólo con medio (6 individuos por grupo).

significativamente la producción de IL-17. Más aún, el mismo efecto fue observado cuando se bloqueó la vía completa (Figura 19B). En contraste, en dadores sanos, ninguno de los esquemas utilizados produjo cambios significativos en la producción de IL-17 (Figura 19A-B).

Como los linfocitos Th17 no son las únicas células productoras de IL-17 (68-73), seguidamente investigamos si el efecto de la señalización a través de PD-1 sobre la producción de IL-17 podría involucrar a otros tipos celulares. Para esto, analizamos la secreción de IL-17 en los linfocitos $TCD4^+$ en CMSP provenientes de pacientes con tuberculosis estimulados con *M.tb* previo bloqueo de PD-1. Como se observa en la figura 19C el agregado de anti-PD-1 y/o anti-PD-Ls incrementó significativamente el porcentaje de células TCD4 $IL\text{-}17^+$. Sin embargo, cuando en el mismo experimento analizamos la intensidad de fluorescencia media (IFM) de dichas células, no se observaron diferencias significativas (Figura 19D), indicando que la vía es capaz de inhibir la expansión de las células Th17 inducidas por el antígeno pero no la cantidad de citoquina producida a nivel de célula individual.

Efecto del IFN-γ sobre los linfocitos Th17 durante la tuberculosis activa.

Existe amplia evidencia que las citoquinas IL-17 e IFN-γ podrían regular negativamente a las células Th1 y Th17 respectivamente (83, 84). Sin embargo, un nuevo estudio ha revelado que el IFN-γ podría condicionar a las CPA a promover el desarrollo de linfocitos Th17 humanos (86). Asimismo, fue demostrado que en células dendríticas de ratones infectados con *Chlamydia muridarum* el tratamiento con anti-IL17 neutralizante induce una significativa reducción de la producción de IFN-γ y un incremento en la producción de IL-4 (263). Estos resultados sugerirían nuevos roles para el IFN-γ e IL-17 en el control de la inflamación, modificándose así el dogma de

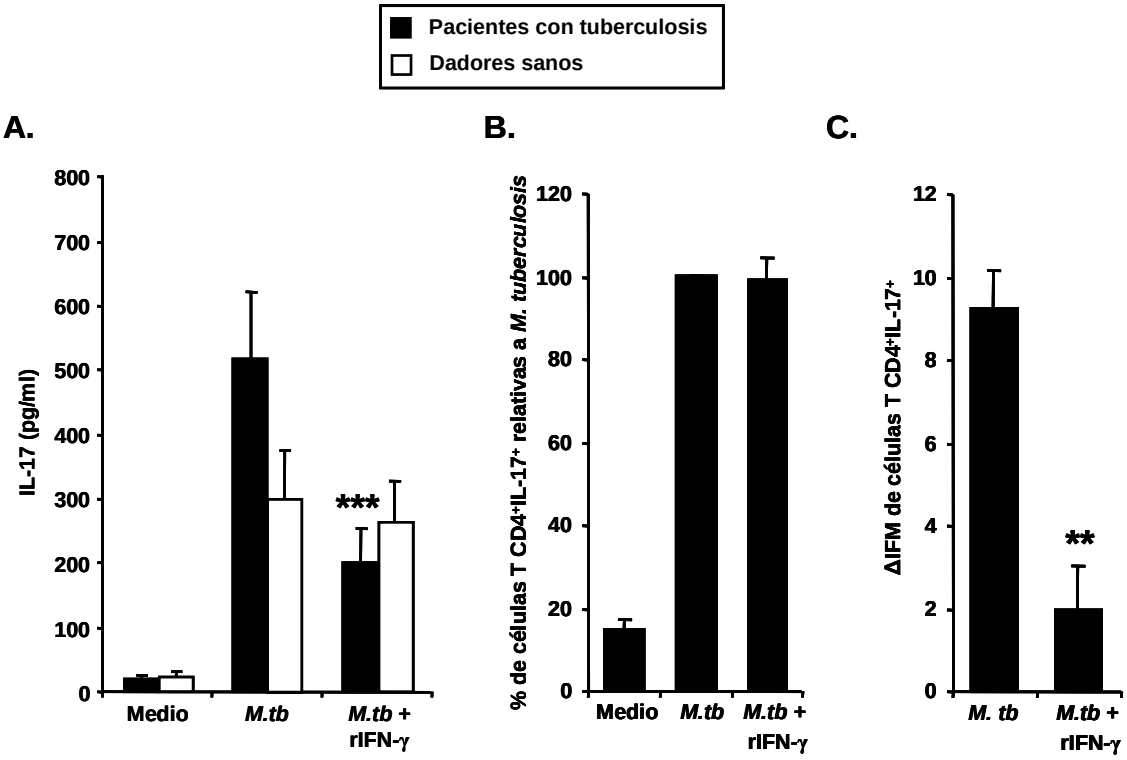

Figura 20. *Regulación de IL-17 a través del IFN-γ en pacientes con tuberculosis y dadores sanos*. CMSP de pacientes con tuberculosis y de dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de rIFN-γ durante 5 días. Luego, se analizó la producción de IL-17 por ELISA. Cada barra representa la media de la producción de IL-17 ± SEM para cada grupo (11 individuos por grupo). ***p< 0.0001, Wilcoxon Rank Sum test. B-C) CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de rIFN-γ. Luego de 5 días se analizó la producción intracelular de Il-17 por citometría de flujo, primero seleccionando una región en los linfocitos según los parámetros de tamaño y granularidad y luego seleccionando las células $CD4^+$. B) Cada barra representa la media del porcentaje de células TCD4 $IL\text{-}17^+$ ± SEM (6 individuos por grupo). D) Cada barra representa la media del delta de la Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) ± SEM de la de las células TCD4 $IL\text{-}17^+$, calculado restando el valor de la IFM de las células TCD4 $IL\text{-}17^+$ cultivadas sólo con medio (6 individuos por grupo). **p< 0.001. Wilcoxon Rank Sum test.

que el IFN-γ suprime a las células Th17 y que la IL-17 inhibe a los linfocitos Th1. Por lo expuesto, nuestro siguiente objetivo fue investigar el efecto del IFN-γ sobre la población Th17 durante la infección por *M. tuberculosis*. Para ello, CMSP de pacientes con tuberculosis y dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* en presencia/ausencia de rIFN-γ y luego de 5 días se determinó la producción de IL-17 por ELISA. En pacientes con tuberculosis, el agregado de rIFN-γ en presencia del antígeno inhibió significativamente

la producción de IL-17 (Figura 20A). Sin embargo, cuando realizamos el mismo estudio en dadores sanos no se detectaron diferencias significativas en la producción de IL-17 luego de agregar rIFN-γ (Figura 20A). Interesantemente, cuando analizamos el efecto sobre la población Th17 observamos que en los pacientes con tuberculosis el rIFN-γ exógeno no modificó el porcentaje de células TCD4 productoras de IL-17 (Figura 20B), pero inhibió marcadamente la cantidad de citoquina producida a nivel de célula individual (Figura 20C). Por lo tanto, en pacientes con tuberculosis, el IFN-γ actuaría como un inhibidor de la secreción de IL-17 por parte de las células Th17. Estos datos correlacionan con estudios previos de nuestro laboratorio donde demostramos que la adición de rIL-17 a células estimuladas *con M.tb* inhibió la producción de IFN-γ en pacientes con tuberculosis (85).

DISCUSION

La asociación entre CD31 y SAP regula la producción de IFN-γ durante la infección con M. tuberculosis.

La defensa efectiva contra una infección intracelular como la ocasionada por *M. tuberculosis*, requiere de la activación de los linfocitos T y de la generación de respuestas de citoquinas de tipo Th1, a fin de controlar y contener la infección. La activación de los linfocitos es regulada por señales disparadas por una gran cantidad de moléculas de superficie, tales como receptores de antígeno, moléculas co-estimulatorias, receptores de quemoquinas, citoquinas, receptotes inhibitorios y TLRs (264). Para lograr una respuesta inmune efectiva frente a patógenos y para el mantenimiento de la tolerancia se requiere del balance entre las señales estimulatorias e inhibitorias (265). En este trabajo se investigó el rol de moléculas co-estimulatorias y proteínas de señalización sobre las funciones efectoras de células T durante la infección activa por *M. tuberculosis*.

Previamente había sido demostrado que CD31 aumenta durante la maduración de las células T $CD4^+$ (148), y que este receptor desempeña un rol inhibitorio interfiriendo con señales de transducción mediadas por el TCR (266). Por ello, en este trabajo se investigó inicialmente la señalización a través de CD31 en las células T durante la infección por *M. tuberculosis*. La estimulación con el antígeno disminuyó la expresión de CD31 en linfocitos T de individuos con fuerte inmunidad contra *M. tuberculosis*, pero la aumentó en los pacientes cuyas células T responden débilmente al antígeno. Estos hallazgos demuestran que un antígeno intracelular humano es capaz de modular la expresión de CD31 durante la activación de células T. Asimismo, al investigar el efecto de la señalización simultáneamente de

CD31 con el TCR en las células de individuos respondedores, se observó una disminución significativa de la secreción de IFN-γ en asociación directa con una fuerte reducción de las células T $SLAM^+$. Sin embargo, la señalización de CD31 no incrementó los niveles de IL-10, lo que sugiere que la activación de la vía de señalización de este receptor en tuberculosis podría participar en la regulación de las respuestas Th1, pero no de las citoquinas Th2. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que SLAM, un receptor que modula el patrón de citoquinas producidas por las células T activadas (119, 267, 268), induce la inmunidad mediada por células durante la infección por *M. tuberculosis* (130), mientras que SAP interactúa con SLAM (128, 184, 269) interfiriendo con la producción de IFN-γ durante la infección por micobacterias (130, 160).

Se postuló que SAP, una proteína presente en las células T (128, 184, 269), células NK (270), y en una subpoblación de células B (271), podría funcionar como un inhibidor de la señalización mediante el bloqueo y/o la regulación de moléculas de señalización. En los linfocitos T SAP se une al dominio SH3 de FynT e impide directamente la interacción de FynT con SLAM (272). En las células B, SAP puede bloquear el reclutamiento de SHP-2 a SLAM (128, 268), posiblemente a través de un mecanismo basado en una mayor afinidad de SAP por SLAM en comparación con la afinidad de SHP-2 con SLAM (271). Asimismo, CD31 también recluta SHP-2 y debido a la alta similitud entre el motivo ITIM de la cola citoplasmática de CD31 y el motivo ITSM de la cola citoplasmática de SLAM se ha sugerido que un mecanismo similar podría estar operando entre SAP y CD31 (160). Nosotros encontramos una marcada asociación entre CD31 y SAP en células sin estimular o luego de tiempos cortos de estimulación con *M.tb*, tanto en

pacientes con tuberculosis como en dadores sanos. Interesantemente, la incubación de las células de pacientes respondedores y dadores sanos al antígeno durante periodos de tiempo más prolongados disminuyó los niveles de expresión de ambas proteínas. En consecuencia, se observó una marcada disminución de la asociación de CD31 y SAP en paralelo con un incremento de la activación especifica de las células T contra el patógeno, como se demuestra por la alta producción de IFN-γ. En contraste, en pacientes bajos respondedores, *M.tb* aumentó los niveles de CD31 y SAP permitiendo una asociación continua de estas moléculas y previniendo la secreción de IFN-γ. Estos resultados muestran que la regulación de la expresión de CD31 y de SAP durante la estimulación con el antígeno se encontraría inversamente asociada con la producción de IFN-γ de manera tiempo dependiente, sugiriendo que ambas moléculas participarían en las vías regulatorias que conducen a la producción de IFN-γ.

En los pacientes XLP, las concentraciones de IFN-γ se elevan durante la infección primaria por el virus de Epstein-Barr, existiendo así un viraje hacia el fenotipo de citoquinas Th1, lo cual contribuye a la progresión de la inmunopatología (269). Anteriormente demostramos que en pacientes XLP, la estimulación con *M.tb* aumenta la producción de IFN-γ e incrementa la expresión de SLAM, mientras que SAP no es detectado (130). Asimismo, nuestros resultados demuestran que *M.tb* disminuye la expresión de CD31 en las células T de pacientes XLP, datos similares a los observados en dadores sanos y en pacientes respondedores al antígeno. Más aún, el IFN-γ inducido por *M.tb* no resultó inhibido en las células T de los pacientes deficientes en SAP luego de la señalización a través de CD31. Estos hallazgos confirmarían que la asociación de CD31 con SAP participaría en la

regulación de la producción de IFN-γ frente a *M. tuberculosis*. Más aún, dado que nuestros resultados han demostrado que la señalización vía CD31 disminuye la secreción de IFN-γ contra un patógeno intracelular humano en los individuos con SAP, estos resultados en los pacientes XLP podrían explicar, en parte, la tendencia a la producción de citoquinas Th1 en estos individuos.

Considerando que *M. tuberculosis* modula la expresión de CD31 en los linfocitos T, que la señalización a través de CD31 disminuye la producción de IFN-γ, y que CD31 interacciona con SAP, un inhibidor de la producción de IFN-γ en tuberculosis, seguidamente analizamos el fenotipo y la función de las células T $CD31^+$ y $CD31^-$ como moduladoras de la producción de IFN-γ inducida por *M. tuberculosis*. Encontramos que los linfocitos T $CD31^-$ constituyen la población principal de las células T productoras de IFN-γ contra el patógeno. Más aún, observamos que en los pacientes respondedores, más del 80% de los linfocitos T $CD31^-$ expresaban SLAM, lo que indicaría que la gran mayoría de las células T secretoras de IFN-γ inducidas por la estimulación antigénica poseerían un fenotipo $CD31^-$ $SLAM^+$. En concordancia con nuestros resultados, ha sido demostrado que la mayoría de la actividad "helper" para la síntesis de IgG por células B y función de memoria para antígenos como el toxoide tetánico, es provista por las células T $CD4^+CD31^-$ (188) y que los ratones deficientes en CD31 muestran niveles elevados de IFN-γ en suero en respuesta a la estimulación sistémica con LPS (151).

Interesantemente, cuando se indujo una señal agonista de CD31 en los linfocitos T de dadores sanos y de pacientes respondedores estimulados con *M. tuberculosis*, no se observó inhibición de la secreción de IFN-γ.

Además, el efecto inhibitorio de la señalización a través de CD31 fue observado en asociación directa con células que expresaban SAP, pero no células de individuos respondedores o de pacientes deficientes en SAP (XLP) estimuladas con *M.tb*. Por lo tanto, en pacientes con tuberculosis que responden fuertemente a la estimulación con el antígeno la expresión de SAP y de CD31 disminuye, y se incrementa la expresión de SLAM en la superficie de la célula T. A su vez, los linfocitos T $SLAM^{+}CD31^{-}$ tienen la capacidad de poder señalizar a través de SLAM y así producir altos niveles de IFN-γ.

Sin embargo, en presencia de un anticuerpo agonista anti-CD31 o rCD31, la estimulación con *M. tuberculosis* no disminuye la expresión de CD31, los linfocitos T expresan SAP y la interacción CD31-CD31 o CD31-ligando altera la señalización a través del TCR impidiendo la producción de IFN-γ. Además, dado que la señalización a través de CD31 disminuye los niveles de SLAM en las células T, algunas moléculas de SAP pueden permanecer unidas a CD31 y/o puede reclutar FynT (160) y unirse a las moléculas remanentes de SLAM, conduciendo a una disminución de células T $CD31^{-}SLAM^{+}$ productoras de IFN-γ. Por otra parte, en los pacientes con tuberculosis no respondedores, *M. tuberculosis* induce una débil señal a través del TCR, y por lo tanto las células T de estos pacientes resultan incapaces de aumentar los niveles de SLAM en la superficie de los linfocitos T. A su vez, en estos pacientes, las proteínas inhibitorias SAP y CD31 están muy aumentadas, generándose muy pocas células T $CD31^{-}$ y llevando a una secreción de IFN-γ insuficiente. Así, los altos niveles de SAP y de CD31 ocasionarían que estas dos proteínas continúen asociadas y/o SAP podría

reclutar FynT y asociarse a SLAM, evitando en ambos casos la secreción de IFN-γ.

Función de la vía de PD-1:PD-Ls sobre la regulación de funciones efectoras de linfocitos T durante la tuberculosis.

Las interacciones de moléculas co-estimulatorias clásicas B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 actúan como interruptores principales que regulan la composición clonal de las células T activadas, por otro lado, los receptores co-estimulatorios como ICOS y PD-1 funcionarían regulando la expansión y las propiedades de las células T activadas (236). Las interacciones ICOS:ICOSL promueven la expansión de las células efectoras e induce el tráfico de dichas células a los tejidos inflamados. Por su parte, las interacciones PD-1:PD-Ls regularían el tráfico de las células T efectoras (236). Al respecto, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la activación de ICOS promueve la inducción de respuestas de citoquinas Th1 frente a *M. tuberculosis* (129, 130). En este trabajo, se analizó el rol de la vía de PD-1:PD-Ls, a fin de profundizar la participación de moléculas co-estimulatorias en la regulación de la activación de células T en tuberculosis.

PD-1:PD-Ls es una vía central en la interacción entre las defensas del huésped para erradicar los patógenos microbianos y las estrategias de los microorganismos que han evolucionado para resistir a las respuestas inmunes. Así, varios trabajos demuestran que las interacciones PD-1:PD-Ls regulan la inmunidad mediada por el daño tisular durante la infección viral crónica (251) y que muchos microorganismos que causan infección persistente explotan la vía PD-1:PD-Ls para evadir los mecanismos inmunes

efectores (251). Más aún, la vía PD-1:PD-Ls contribuye directamente a la disfunción de las células T y a la falta de control viral en el establecimiento de la infección crónica, tanto en ratones (273) como en humanos (122, 193, 194). Del mismo modo, en infecciones persistentes con patógenos bacterianos, como *Helicobacter pylori* y *Porphyromonas gingivalis* PD-L1 se expresa en altos niveles en células epiteliales gástricas (274) y en monocitos (243), respectivamente, sugiriendo una posible participación de esta proteína en la promoción de la infección crónica (274). Sin embargo, la función de la interacción PD-1:PD-Ls sobre las vías regulatorias que contribuyen a la persistencia de las bacterias intracelulares no ha sido investigado. Por lo tanto, en este estudio se evaluó la función de la vía de PD-1:PD-Ls en pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

Dado que la producción de IFN-γ y la diferenciación hacia un perfil de citoquinas Th1 son mediadores esenciales de la protección frente a *M. tuberculosis* (245) y que la expresión de PD-1 es inducida por la señalización a través del TCR y puede ser aumentada por citoquinas pro-inflamatorias (275), iniciamos nuestro estudio analizando los niveles de PD-1 luego de la estimulación con *M. tuberculosis*. Teniendo en cuenta que tanto las respuestas de células T circulantes como las respuestas de los linfocitos en el sitio de infección son importantes en la respuesta inmune del huésped frente a *M. tuberculosis*, investigamos la expresión de PD-1 en las células T de sangre periférica y líquido pleural de pacientes con tuberculosis. Nuestros resultados mostraron una asociación directa entre PD-1 e IFN-γ tanto en el sitio de infección, así como en sangre periférica de pacientes con tuberculosis luego de la estimulación antigénica. Estos resultados indicarían que las células T de pacientes con una fuerte

respuesta de sus células T contra el patógeno serían sistemáticamente activadas por el antígeno específico, induciendo la producción de IFN-γ y generando un microambiente Th1 que a su vez conlleva a aumentar la expresión de PD-1. Más aun, en estos pacientes, virtualmente todas las células T que secretan IFN-γ expresan PD-1 en su superficie.

En contraste, las células T sistémicas de pacientes con tuberculosis que responden débilmente al antígeno producen IL-10 pero muy bajos niveles de IFN-γ (130), generando un microambiente de citoquinas predominante Th2 que impide el aumento en los niveles de PD-1 sobre las células T. Este impedimento del incremento de la expresión de PD-1 podría estar relacionado con la baja frecuencia de las células T antígeno específicas en comparación con la frecuencia observada en los pacientes respondedores. Sin embargo, los linfocitos T de pacientes no respondedores del sitio de infección presentaron un elevado número de células T antígeno especificas que son capaces de secretar altos niveles de IFN-γ e incrementar la expresión de PD-1 en respuesta al estímulo antigénico. Estos hallazgos concuerdan con trabajos previos que muestran que los linfocitos T del líquido pleural de pacientes con tuberculosis se polarizan hacia un fenotipo de citoquinas Th1 (276). Más aún, observamos que el agregado de anti-IFN-γ inhibió marcadamente los niveles de PD-1 inducidos por *M.tb*, mientras que la adición exógena de rIFN-γ incrementó significativamente la expresión de PD-1 en las células T sistémicas de pacientes bajos respondedores.

En conjunto, en este trabajo se demuestra que la estimulación con *M.tb* induce la secreción de IFN-γ por las células T de pacientes con

tuberculosis, que esta citoquina activa a los linfocitos T e incrementa la expresión PD-1 de manera antígeno específica.

PD-1 posee dos ligandos conocidos con los cuales interactúa, PD-L1 y PD-L2, los cuales difieren en sus patrones de expresión. Mientras ha sido reportado que PD-L1 se encuentra expresado en las células T, las células B, CD, macrófagos, células no hematopoyéticas y otros tipos celulares, la expresión de PD-L2 parecería ser mucho más restringida, limitándose su expresión hasta el momento a las CD, las células B1 y macrófagos (200, 251). En este trabajo demostramos que la expresión de ambos ligandos de PD-1 es inducida en las células T de pacientes con tuberculosis en respuesta a *M.tb*, lo que demuestra por primera vez que PD-L2 puede expresarse en la superficie de las células T humanas. Además, tanto los niveles de PD-L1 como de PD-L2 aumentaron significativamente en respuesta al IFN-γ inducido por el antígeno, aún en las CMSP de los pacientes bajos respondedores que secretan bajos niveles de la citoquina.

En concordancia, había sido demostrado que la expresión PD-L1 podría ser inducida por bajas dosis de IFN-γ en monocitos/macrófagos (199, 256). Más aún, la expresión de PD-L1 en los macrófagos podría ser inducida por el IFN-γ (256), lo cual indicaría que las células Th1, así como productos microbianos, podrían aumentar los niveles de PD-L1 en diferentes tipos celulares, tanto en humanos como en ratones (127, 256). Si bien otros trabajos sugirieron que PD-L2 podría ser inducido en los macrófagos de ratón mediante la activación por IL-4 (256), nuestros resultados demostraron que en la infección por *M. tuberculosis*, incluso bajos niveles de IFN-γ podrían aumentar la expresión de PD-L2 en las células T. En conjunto, nuestros datos indicarían que *M. tuberculosis* induce la expresión

tanto de PD-1 como de sus ligandos en las células T de pacientes con enfermedad activa.

Seguidamente, evaluamos la función fisiológica de la interacción de PD-1 y sus ligandos, en particular analizamos el efecto de la interacción PD-1:PD-Ls sobre el porcentaje de células productoras de IFN-γ y sobre la actividad citotóxica contra el patógeno. Estudios previos con anticuerpos bloqueantes y ratones knockout sugirieron importantes funciones inhibitorias de la vía PD-1:PD-Ls *in vivo* (198, 277, 278). Sin embargo, otros reportes establecen que PD-L1 y/o PD-L2 podrían tener una señal bidireccional (205, 208). Nuestros datos demostraron que el bloqueo de PD-1 y/o la vía completa PD-1:PD-Ls, produce un aumento significativo en el número de células T $CD3^+IFN\text{-}\gamma^+$ y de los linfocitos T $CD8^+CD107a/b^+$ frente a *M.tb*. En CMSP, las interacciones PD-1:PD-Ls mostraron una activa inhibición conjunta de la producción de IFN-γ y de la degranulación lítica sólo en pacientes con una fuerte inmunidad mediada por células contra el patógeno. Sin embargo, en el sitio de la infección, el bloqueo de la vía PD-1:PD-Ls aumentó claramente las funciones efectoras de las células T en ambos grupos de pacientes con tuberculosis. Debido a que la pleuresía tuberculosa es una respuesta inmune intensa a las micobacterias que resulta en la eliminación de los microorganismos del espacio pleural, nuestros hallazgos indicarían que la vía PD-1:PD-Ls podría tener un importante rol en el sitio de la infección, donde la inflamación y la inmunidad mediada por células requieren de contención por parte del huésped.

Los individuos bajo respondedores producen muy bajos niveles de IFN-γ y limitada capacidad de degranulación lítica en respuesta a *M.*

tuberculosis, sus células T de sangre periférica expresan bajos niveles de PD-1 y el bloqueo de la vía PD-1:PD-Ls no afectó las funciones efectoras de las células T. Previamente, demostramos que la señalización a través de SLAM sí regula las funciones efectoras de los pacientes bajos respondedores, aumentando la producción de IFN-γ mientras que la señalización a través de ICOS no logró incrementar los niveles de esta citoquina en estos pacientes (129, 130). Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que la intensidad de las respuestas en los pacientes con tuberculosis podría depender de la ausencia del efecto de una vía co-estimulatoria en particular y/o de la ausencia de suficientes células T antígeno-específica reactivas.

Hasta la fecha, la literatura sobre los efectos de las interacciones PD-1:PD-Ls sobre la capacidad citolítica de los LT citotóxicos ha sido contradictoria, con reportes que sugieren inhibición de la citotoxicidad (279) y otros que sugieren que la vía no produciría efecto sobre la misma (219). Nuestros resultados demuestran que en tuberculosis las interacciones PD-1:PD-Ls funcionarían como una vía inhibitoria de la degranulación lítica antígeno-especifica de las células T CD8 frente a *M. tuberculosis*. En concordancia, varios grupos han demostrado que el bloqueo de las interacciones PD-1:PD-Ls in vitro en infecciones por HIV o el virus de la hepatitis C, revierte el agotamiento de las células T CD8 y CD4 específicas, restaurando la producción de citoquinas y la proliferación celular (194, 195, 243, 280). Más aún, la administración de un anticuerpo especifico anti-PD-L1 conlleva a un aumento exacerbado de la queratitis inducida por células T CD4-específicas en la infección por VHS, además de un aumento de la proliferación de células T efectoras, la producción de IFN-γ, y la

supervivencia. Estos resultados sugerirían que PD-L1 podría participar en la limitación de la respuesta inmune mediada por el daño tisular en la infección por herpes inductores de queratitis estromal (244). Además, se reportó que durante la infección por el virus de la hepatitis B, las interacciones PD-1:PD-L1 contribuyen a la supresión de la secreción de IFN-γ luego del reconocimiento antigénico en el hígado (281). Por otra parte, en la infección por *H. pylori*, el tratamiento con anti-PD-L1 provocó un aumento de la proliferación de células T y de la secreción de IL-12 (245). Nuestros datos aportan información al tema descripto indicando que la vía PD-1:PD-Ls cumple un rol inhibitorio sobre la producción de IFN-γ en la infección crónica humana por *M. tuberculosis*.

En comparación con los pacientes con tuberculosis no respondedores, los pacientes respondedores mostraron una mayor expresión de PD-1, PD-L1, y PD-L2, y una fuerte respuesta de células T efectoras luego del bloqueo de la vía PD-1:PD-Ls. Estudios recientes en ratones sugirieron la presencia de bacterias en un compartimiento pulmonar desde el cual no pueden ser movilizadas a los ganglios linfáticos (282). En base a los mencionados resultados, una potencial hipótesis para explicar las diferencias halladas en la respuesta inmune de los dos grupos de pacientes indicaría que en los pacientes no respondedores, existirían variaciones en el transporte de las bacterias desde los pulmones a los nódulos linfáticos locales, impidiendo o dificultando la completa activación de células T. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para hallar un mecanismo inmunológico que explique la débil respuesta de las células T de los pacientes no respondedores.

Nuestros resultados muestran que, incluso en el sitio de infección, los pacientes bajos respondedores produjeron niveles más bajos de IFN-γ,

en comparación con los pacientes respondedores. Como previamente demostramos que los parámetros inmunológicos correlacionan con la severidad de la enfermedad (129), investigamos si en los pacientes bajos respondedores se podría incrementar producción de IFN-γ hasta niveles comparables a los secretados por pacientes respondedores. Ha sido reportado que el bloqueo de una vía inhibitoria simultáneamente con la estimulación de una vía activadora incrementaría las funciones de las células T efectoras (283). Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos bloquear PD-1 y conjuntamente co-estimular vía SLAM en ambos grupos de pacientes. Interesantemente, observamos que este tratamiento simultáneo indujo un aumento de los niveles de IFN-γ en los pacientes no respondedores hasta niveles comparados a los producidos por pacientes respondedores frente al antígeno. En conclusión, en este trabajo demostramos un rol inhibitorio de la vía PD-1:PD-Ls durante la tuberculosis pulmonar activa. Más aún, la combinación de nuestros datos recientes con nuestros hallazgos anteriores sobre el rol positivo de SLAM e ICOS en tuberculosis, sugieren que el uso de anticuerpos bloqueantes y agonistas podría tener importantes implicaciones en posibles terapias para enfermedades infecciosas bacterianas crónicas como la tuberculosis. Este estudio sugiere, además, que PD-1 puede ser un punto focal para la modulación terapéutica de las respuestas de citoquinas de las células T en la tuberculosis.

Regulación de las células Th17 a través de la vía de PD-1 en pacientes con tuberculosis.

El rol de IL-17 en la tuberculosis humana no ha sido completamente dilucidado, en particular aún no se conoce si la subpoblación Th17 tiene un rol perjudicial o benéfico en esta infección. Ha sido propuesto que el balance entre las vías IL-12/IFN-γ e IL-23/IL-17 definiría la resolución de la infección por *M. tuberculosis* (80). Más aún, varias publicaciones demuestran que la IL-17 podría estar involucrada en el mantenimiento de la integridad del granuloma y que la ausencia de esta citoquina generaría una deficiencia en la migración de los neutrófilos al sitio de infección (80, 284-286). Por lo tanto, la subpoblación Th17 podría ser clave en el inicio de la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, especialmente en la contención de la infección y el crecimiento bacteriano. Sin embargo, son las células Th1 las que posteriormente, participan en la inhibición del crecimiento bacteriano y la generación de una respuesta inmune protectiva en tuberculosis. Ha sido reportado que *M. tuberculosis* induce la generación tanto de respuestas Th1 como Th17 durante la progresión de la enfermedad, si bien no existen reportes a la fecha que muestren estos resultados en pacientes con enfermedad activa. En este trabajo nosotros demostramos que efectivamente *M. tuberculosis* induce la producción de IL-17 y de IFN-γ tanto en pacientes con tuberculosis como en dadores sanos. Sin embargo, si bien ambas respuestas se estarían generando, los pacientes con tuberculosis producen una mayor respuesta Th17 y una menor respuesta Th1 en comparación con los dadores sanos.

Hasta el momento son varias las moléculas co-estimulatorias que se han identificado en la superficie de los linfocitos Th17, tales como CD28, CTLA-4, ICOS y PD-1 (287). Más aún, se ha demostrado que durante la activación policlonal de células humanas, PD-1 e ICOS incrementan su expresión, mientras que CD28 y CTLA-4 no se modifican en las células Th17 (287). Existen numerosos estudios sobre la biología de las células Th17, los cuales han llevado a la identificación de múltiples citoquinas y factores celulares asociados que limitan su expansión. Sin embargo, son muy pocos los estudios realizados sobre la función de las moléculas co-estimulatorias en esta población, aunque existe una presunción general de que también modularían la actividad de los linfocitos Th17 (288). Estudios recientes mostraron que la señalización a través de CD28 disminuye la proliferación de las células Th17 naive pero incrementa la producción de IL-17 en las células Th17 diferenciadas (289). Asimismo, se reportó que las CD maduras resultan menos eficaces que las CD en la conducción de la polarización hacia Th17 y que CTLA-4 favorecería esta diferenciación (289). Estos datos sugieren fuertemente que estas moléculas co-estimulatorias se encuentran implicadas en la regulación de la diferenciación Th17, pero no excluyen el rol de otras moléculas estimulatorias o inhibitorias adicionales. Además, considerando que i) ha sido ampliamente reportado que la vía de PD-1 y de CTLA-4 inhiben la activación/diferenciación y la expansión/proliferación de las células Th1 a través de mecanismos similares (236); ii), estudios recientes demostraron que CTLA-4 también inhibe dichas funciones en las células Th17 (289) y que iii) PD-1 se expresa en linfocitos Th17, nosotros postulamos que PD-1 podría regular la diferenciación y expansión de los linfocitos Th17 en tuberculosis. Nosotros demostramos que la estimulación

con *M. tuberculosis* incrementa la expresión de PD-1 en la superficie de los linfocitos Th17. Además, demostramos que el bloqueo de la señalización a través de la vía PD-1:PD-Ls incrementó la expansión de la población Th17. Por lo tanto, concluimos que PD-1 limitaría la respuesta de los linfocitos Th17 durante la infección por *M. tuberculosis*.

Los niveles relativos de IL-12 e IL-23 inducidos por las CPA durante la infección micobacteriana resultan cruciales en el balance entre linfocitos Th1 y Th17. En la infección primaria con *M. tuberculosis*, inicialmente tanto las células Th1 como las Th17 son inducidas (81, 290). Sin embargo, en el mismo modelo de ratón pero infectando los animales con BCG, la respuesta Th17 es rápidamente suprimida por la respuesta Th1 a través de la inducción diferencial de IL-12 e IL-23 (291). Más aún, se observó que CD infectadas con BCG producen altos niveles de IFN-γ que incrementan drásticamente los niveles de IL-12p70. Esto produce una reducción de los niveles de IL-23 y por ello una disminución de las células Th17 (291). Estos datos sugieren que la regulación cruzada entre IL-12 e IL-23 y entre IFN-γ e IL-17 resultaría decisiva en el resultado de la inflamación en infecciones por micobacterias.

A pesar de que se ha establecido que la IL-6, el TGF-β, IL-21 e IL-23 son los mediadores responsables de la diferenciación y expansión de los linfocitos Th17, los antagonistas de esta respuesta fisiológica no resultan tan claros. Ha sido descripto que las citoquinas Th1 y Th2 regulan negativamente la diferenciación de las células Th17. La adición de IL-12, IFN-γ o IL-4 suprime a IL-23 y TGF- β (74, 79, 292). Sin embargo, nuevos estudios han revelado que el IFN-γ podría promover el desarrollo de los linfocitos Th17, tanto en humanos como en ratón (86, 263), sugiriendo

nuevos roles para el IFN-γ e IL-17 en el control de la inflamación y modificándose así el dogma que el IFN-γ suprime a las células Th17 y que la IL-17 inhibe a los linfocitos Th1. En este contexto nosotros observamos que el IFN-γ no inhibe la expansión de la población Th17 inducida por *M.tb* pero claramente produce una fuerte inhibición de la secreción de IL-17 por estas células. Más aún, previamente demostramos que la adición de rIL-17 a células estimuladas *con M.tb* inhibe la producción de IFN-γ en pacientes con tuberculosis (85).

En conjunto, observamos que las citoquinas IL-17 e IFN-γ se regularían negativamente entre sí durante la infección por *M. tuberculosis*. En cambio, la interacción de PD-1 con sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) resultaría en una potente inhibición de la expansión de las células Th17 y Th1. Por lo tanto, este estudio sugiere que PD-1 podría ser una molécula clave para la modulación terapéutica de las respuestas de citoquinas de las células T en la tuberculosis.

CONCLUSION

En este trabajo demostramos que la interacción entre las proteínas inhibitorias CD31 y SAP regula las vías que conducen a la producción de IFN-γ durante la tuberculosis pulmonar activa. Más aún, en individuos con una fuerte inmunidad mediada por células contra el patógeno, la estimulación antígeno específica induce en las células productoras IFN-γ el fenotipo $CD31^{-}SLAM^{+}$.

Asimismo, se demostró el rol inhibitorio de la vía PD-1:PD-Ls sobre las funciones efectoras de las células Th1 durante la tuberculosis pulmonar activa. Más aún, frente a este patógeno, una de las funciones de la vía de PD-1:PD-Ls sería inhibir la expansión de las poblaciones Th1 y Th17. Por lo tanto, PD-1 participaría en la modulación de la activación y la expansión de las células Th1 y Th17, impidiendo la exacerbación de ambas respuestas.
La combinación de los resultados aquí presentados con resultados previos de nuestro laboratorio sobre el rol de SLAM e ICOS en tuberculosis, demuestran que el uso de anticuerpos bloqueantes y agonistas podrían tener importantes implicancias en potenciales terapias para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas crónicas como la tuberculosis.

En conjunto, los resultados mostrados en este trabajo contribuyen significativamente con información sobre el rol de proteínas de señalización en la modulación del IFN-γ durante la infección por un patógeno intracelular, ampliando nuestros conocimientos sobre la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*.

REFERENCIAS

1. World Health Organization, Global Tuberculosis Control, A short update to the 2009 report.
2. Condos, R., B. Raju, A. Canova, B. Y. Zhao, M. Weiden, W. N. Rom, and R. Pine. 2003. Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages in vitro and in tuberculosis patients. *Infect Immun* 71:2058-2064.
3. Subramanyam, S., L. E. Hanna, P. Venkatesan, K. Sankaran, P. R. Narayanan, and S. Swaminathan. 2004. HIV alters plasma and M. tuberculosis-induced cytokine production in patients with tuberculosis. *J Interferon Cytokine Res* 24:101-106.
4. Hertoghe, T., A. Wajja, L. Ntambi, A. Okwera, M. A. Aziz, C. Hirsch, J. Johnson, Z. Toossi, R. Mugerwa, P. Mugyenyi, R. Colebunders, J. Ellner, and G. Vanham. 2000. T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co)pathogenesis of HIV and pulmonary tuberculosis (TB). *Clin Exp Immunol* 122:350-357.
5. Toossi, Z. 2003. Virological and immunological impact of tuberculosis on human immunodeficiency virus type 1 disease. *J Infect Dis* 188:1146-1155.
6. Small, P. M., and P. I. Fujiwara. 2001. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med* 345:189-200.
7. Ferraz, J. C., F. B. Melo, M. F. Albuquerque, S. M. Montenegro, and F. G. Abath. 2006. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res* 39:1387-1397.
8. Fenton, M. J., and M. W. Vermeulen. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 64:683-690.
9. Stenger, S., and M. Rollinghoff. 2001. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann Rheum Dis* 60 Suppl 3:iii43-46.
10. van Crevel, R., T. H. Ottenhoff, and J. W. van der Meer. 2002. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 15:294-309.
11. Schlesinger, L. S., C. G. Bellinger-Kawahara, N. R. Payne, and M. A. Horwitz. 1990. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol* 144:2771-2780.
12. Ernst, J. D. 1998. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 66:1277-1281.
13. Gaynor, C. D., F. X. McCormack, D. R. Voelker, S. E. McGowan, and L. S. Schlesinger. 1995. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol* 155:5343-5351.
14. Beharka, A. A., C. D. Gaynor, B. K. Kang, D. R. Voelker, F. X. McCormack, and L. S. Schlesinger. 2002. Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol* 169:3565-3573.
15. Berrington, W. R., and T. R. Hawn. 2007. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 219:167-186.
16. Salgame, P. 2005. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Curr Opin Immunol* 17:374-380.
17. Fortune, S. M., A. Solache, A. Jaeger, P. J. Hill, J. T. Belisle, B. R. Bloom, E. J. Rubin, and J. D. Ernst. 2004. Mycobacterium tuberculosis inhibits macrophage

responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 172:6272-6280.

18. Noss, E. H., R. K. Pai, T. J. Sellati, J. D. Radolf, J. Belisle, D. T. Golenbock, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 167:910-918.
19. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom. 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* 2:561-572.
20. Liu, P. T., S. Stenger, H. Li, L. Wenzel, B. H. Tan, S. R. Krutzik, M. T. Ochoa, J. Schauber, K. Wu, C. Meinken, D. L. Kamen, M. Wagner, R. Bals, A. Steinmeyer, U. Zugel, R. L. Gallo, D. Eisenberg, M. Hewison, B. W. Hollis, J. S. Adams, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 2006. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311:1770-1773.
21. Denis, M. 1991. Killing of Mycobacterium tuberculosis within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol* 84:200-206.
22. Wilkinson, R. J., M. Llewelyn, Z. Toossi, P. Patel, G. Pasvol, A. Lalvani, D. Wright, M. Latif, and R. N. Davidson. 2000. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 355:618-621.
23. Auricchio, G., S. K. Garg, A. Martino, E. Volpe, A. Ciaramella, P. De Vito, P. M. Baldini, V. Colizzi, and M. Fraziano. 2003. Role of macrophage phospholipase D in natural and CpG-induced antimycobacterial activity. *Cell Microbiol* 5:913-920.
24. Estaquier, J., T. Idziorek, W. Zou, D. Emilie, C. M. Farber, J. M. Bourez, and J. C. Ameisen. 1995. T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* 182:1759-1767.
25. Rosenzweig, S. D., and S. M. Holland. 2005. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev* 203:38-47.
26. Brombacher, F., R. A. Kastelein, and G. Alber. 2003. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol* 24:207-212.
27. Chan, J., Y. Xing, R. S. Magliozzo, and B. R. Bloom. 1992. Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 175:1111-1122.
28. Schindler, H., M. B. Lutz, M. Rollinghoff, and C. Bogdan. 2001. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol* 166:3075-3082.
29. Wang, J., J. Wakeham, R. Harkness, and Z. Xing. 1999. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest* 103:1023-1029.
30. Fricke, I., D. Mitchell, J. Mittelstadt, N. Lehan, H. Heine, T. Goldmann, A. Bohle, and S. Brandau. 2006. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol* 176:5173-5182.
31. Stenger, S. 2005. Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 4:iv24-28.

32. Flynn, J. L., and J. Chan. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19:93-129.
33. Cooper, A. M., L. B. Adams, D. K. Dalton, R. Appelberg, and S. Ehlers. 2002. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol* 10:221-226.
34. Keane, J., M. K. Balcewicz-Sablinska, H. G. Remold, G. L. Chupp, B. B. Meek, M. J. Fenton, and H. Kornfeld. 1997. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 65:298-304.
35. Algood, H. M., J. Chan, and J. L. Flynn. 2003. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:467-477.
36. Tessier, P. A., P. H. Naccache, I. Clark-Lewis, R. P. Gladue, K. S. Neote, and S. R. McColl. 1997. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol* 159:3595-3602.
37. Lande, R., E. Giacomini, T. Grassi, M. E. Remoli, E. Iona, M. Miettinen, I. Julkunen, and E. M. Coccia. 2003. IFN-alpha beta released by Mycobacterium tuberculosis-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. *J Immunol* 170:1174-1182.
38. Peters, W., J. G. Cyster, M. Mack, D. Schlondorff, A. J. Wolf, J. D. Ernst, and I. F. Charo. 2004. CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 172:7647-7653.
39. Kipnis, A., R. J. Basaraba, I. M. Orme, and A. M. Cooper. 2003. Role of chemokine ligand 2 in the protective response to early murine pulmonary tuberculosis. *Immunology* 109:547-551.
40. Buettner, M., C. Meinken, M. Bastian, R. Bhat, E. Stossel, G. Faller, G. Cianciolo, J. Ficker, M. Wagner, M. Rollinghoff, and S. Stenger. 2005. Inverse correlation of maturity and antibacterial activity in human dendritic cells. *J Immunol* 174:4203-4209.
41. Bhatt, K., S. P. Hickman, and P. Salgame. 2004. Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. *J Immunol* 172:2748-2751.
42. Khader, S. A., S. Partida-Sanchez, G. Bell, D. M. Jelley-Gibbs, S. Swain, J. E. Pearl, N. Ghilardi, F. J. Desauvage, F. E. Lund, and A. M. Cooper. 2006. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 203:1805-1815.
43. Demangel, C., P. Bertolino, and W. J. Britton. 2002. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *Eur J Immunol* 32:994-1002.
44. Makino, M., Y. Maeda, T. Mukai, and S. H. Kaufmann. 2006. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1beta. *Eur J Immunol* 36:1443-1452.
45. Hanekom, W. A., M. Mendillo, C. Manca, P. A. Haslett, M. R. Siddiqui, C. Barry, 3rd, and G. Kaplan. 2003. Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *J Infect Dis* 188:257-266.
46. Bhatt, K., and P. Salgame. 2007. Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Immunol* 27:347-362.

47. Saunders, B. M., A. A. Frank, A. M. Cooper, and I. M. Orme. 1998. Role of gamma delta T cells in immunopathology of pulmonary Mycobacterium avium infection in mice. *Infect Immun* 66:5508-5514.
48. Vankayalapati, R., A. Garg, A. Porgador, D. E. Griffith, P. Klucar, H. Safi, W. M. Girard, D. Cosman, T. Spies, and P. F. Barnes. 2005. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* 175:4611-4617.
49. Fields, P. E., and R. A. Flavell. 2001. Helper T cell differentiation: a role for SAP? *Nat Immunol* 2:382-384.
50. Spellberg, B., and J. E. Edwards, Jr. 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 32:76-102.
51. Flynn, J. L. 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* 84:93-101.
52. Ottenhoff, T. H., F. A. Verreck, M. A. Hoeve, and E. van de Vosse. 2005. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 85:53-64.
53. Klucar, P., P. F. Barnes, Y. Kong, B. Samten, A. Tvinnereim, R. Spallek, G. T. Nepom, M. Singh, and H. Shams. 2008. Characterization of effector functions of human peptide-specific CD4+ T-cell clones for an intracellular pathogen. *Hum Immunol* 69:475-483.
54. Orme, I. M., E. S. Miller, A. D. Roberts, S. K. Furney, J. P. Griffin, K. M. Dobos, D. Chi, B. Rivoire, and P. J. Brennan. 1992. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of Mycobacterium tuberculosis infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J Immunol* 148:189-196.
55. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, K. J. Triebold, B. Koller, and B. R. Bloom. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12013-12017.
56. Doffinger, R., S. Patel, and D. S. Kumararatne. 2005. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. *Curr Opin Rheumatol* 17:440-446.
57. MacMicking, J. D., G. A. Taylor, and J. D. McKinney. 2003. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 302:654-659.
58. Gutierrez, M. G., S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo, and V. Deretic. 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119:753-766.
59. Ladel, C. H., C. Blum, A. Dreher, K. Reifenberg, and S. H. Kaufmann. 1995. Protective role of gamma/delta T cells and alpha/beta T cells in tuberculosis. *Eur J Immunol* 25:2877-2881.
60. Ladel, C. H., J. Hess, S. Daugelat, P. Mombaerts, S. Tonegawa, and S. H. Kaufmann. 1995. Contribution of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes to immunity against Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin: studies with T cell receptor-deficient mutant mice. *Eur J Immunol* 25:838-846.
61. Schaible, U. E., and S. H. Kaufmann. 2000. CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Semin Immunol* 12:527-535.
62. Ulrichs, T., and S. A. Porcelli. 2000. CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet* 2:416-432.

63. Dieli, F., N. Caccamo, S. Meraviglia, J. Ivanyi, G. Sireci, C. T. Bonanno, V. Ferlazzo, C. La Mendola, and A. Salerno. 2004. Reciprocal stimulation of gammadelta T cells and dendritic cells during the anti-mycobacterial immune response. *Eur J Immunol* 34:3227-3235.
64. Bettelli, E., M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8:345-350.
65. Steinman, L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13:139-145.
66. Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
67. Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein, and J. D. Sedgwick. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748.
68. Cupedo, T., N. K. Crellin, N. Papazian, E. J. Rombouts, K. Weijer, J. L. Grogan, W. E. Fibbe, J. J. Cornelissen, and H. Spits. 2009. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat Immunol* 10:66-74.
69. Ferretti, S., O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones, and A. Trifilieff. 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170:2106-2112.
70. Lockhart, E., A. M. Green, and J. L. Flynn. 2006. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 177:4662-4669.
71. Molet, S., Q. Hamid, F. Davoine, E. Nutku, R. Taha, N. Page, R. Olivenstein, J. Elias, and J. Chakir. 2001. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 108:430-438.
72. Rachitskaya, A. V., A. M. Hansen, R. Horai, Z. Li, R. Villasmil, D. Luger, R. B. Nussenblatt, and R. R. Caspi. 2008. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol* 180:5167-5171.
73. Liu, S. J., J. P. Tsai, C. R. Shen, Y. P. Sher, C. L. Hsieh, Y. C. Yeh, A. H. Chou, S. R. Chang, K. N. Hsiao, F. W. Yu, and H. W. Chen. 2007. Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J Leukoc Biol* 82:354-360.
74. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
75. Kolls, J. K., and A. Linden. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21:467-476.
76. Scriba, T. J., B. Kalsdorf, D. A. Abrahams, F. Isaacs, J. Hofmeister, G. Black, H. Y. Hassan, R. J. Wilkinson, G. Walzl, S. J. Gelderbloem, H. Mahomed, G. D. Hussey, and W. A. Hanekom. 2008. Distinct, Specific IL-17- and IL-22-

Producing CD4+ T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response. *J Immunol* 180:1962-1970.

77. Khader, S. A., and A. M. Cooper. 2008. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* 41:79-83.
78. Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon, and J. K. Kolls. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194:519-527.
79. Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133-1141.
80. Khader, S. A., and A. M. Cooper. 2008. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*.
81. Khader, S. A., J. E. Pearl, K. Sakamoto, L. Gilmartin, G. K. Bell, D. M. Jelley-Gibbs, N. Ghilardi, F. deSauvage, and A. M. Cooper. 2005. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* 175:788-795.
82. Happel, K. I., E. A. Lockhart, C. M. Mason, E. Porretta, E. Keoshkerian, A. R. Odden, S. Nelson, and A. J. Ramsay. 2005. Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of Mycobacterium tuberculosis in the lungs. *Infect Immun* 73:5782-5788.
83. Mills, K. H. 2008. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* 38:2636-2649.
84. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
85. Pasquinelli, V., J. C. Townsend, J. O. Jurado, I. B. Alvarez, M. F. Quiroga, P. F. Barnes, B. Samten, and V. E. Garcia. 2009. IFN-gamma production during active tuberculosis is regulated by mechanisms that involve IL-17, SLAM, and CREB. *J Infect Dis* 199:661-665.
86. Kryczek, I., S. Wei, W. Gong, X. Shu, W. Szeliga, L. Vatan, L. Chen, G. Wang, and W. Zou. 2008. Cutting edge: IFN-gamma enables APC to promote memory Th17 and abate Th1 cell development. *J Immunol* 181:5842-5846.
87. Shi, G., C. A. Cox, B. P. Vistica, C. Tan, E. F. Wawrousek, and I. Gery. 2008. Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J Immunol* 181:7205-7213.
88. Stritesky, G. L., N. Yeh, and M. H. Kaplan. 2008. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol* 181:5948-5955.
89. Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8:639-646.
90. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F.

Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204:1849-1861.

91. Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi, and S. Romagnani. 2008. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 20:1361-1368.
92. Chen, Z., A. Laurence, and J. J. O'Shea. 2007. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 19:400-408.
93. van Beelen, A. J., M. B. Teunissen, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 2007. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7:374-381.
94. Garg, A., P. F. Barnes, S. Roy, M. F. Quiroga, S. Wu, V. E. Garcia, S. R. Krutzik, S. E. Weis, and R. Vankayalapati. 2008. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol*.
95. Li, L., S. H. Lao, and C. Y. Wu. 2007. Increased frequency of CD4(+)CD25(high) Treg cells inhibit BCG-specific induction of IFN-gamma by CD4(+) T cells from TB patients. *Tuberculosis (Edinb)* 87:526-534.
96. Hougardy, J. M., S. Place, M. Hildebrand, A. Drowart, A. S. Debrie, C. Locht, and F. Mascart. 2007. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176:409-416.
97. Chen, X., B. Zhou, M. Li, Q. Deng, X. Wu, X. Le, C. Wu, N. Larmonier, W. Zhang, H. Zhang, H. Wang, and E. Katsanis. 2007. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol* 123:50-59.
98. Cooper, A. M. 2009. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 27:393-422.
99. Awomoyi, A. A., A. Marchant, J. M. Howson, K. P. McAdam, J. M. Blackwell, and M. J. Newport. 2002. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* 186:1808-1814.
100. Weir, R. E., G. F. Black, H. M. Dockrell, S. Floyd, P. E. Fine, S. D. Chaguluka, S. Stenson, E. King, B. Nazareth, D. K. Warndorff, B. Ngwira, A. C. Crampin, L. Mwaungulu, L. Sichali, E. Jarman, L. Donovan, and J. M. Blackwell. 2004. Mycobacterial purified protein derivatives stimulate innate immunity: Malawians show enhanced tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), and IL-10 responses compared to those of adolescents in the United Kingdom. *Infect Immun* 72:1807-1811.
101. Henao, M. I., C. Montes, S. C. Paris, and L. F. Garcia. 2006. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 86:11-19.
102. Toossi, Z., P. Gogate, H. Shiratsuchi, T. Young, and J. J. Ellner. 1995. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol* 154:465-473.
103. Lienhardt, C., A. Azzurri, A. Amedei, K. Fielding, J. Sillah, O. Y. Sow, B. Bah, M. Benagiano, A. Diallo, R. Manetti, K. Manneh, P. Gustafson, S. Bennett, M. M. D'Elios, K. McAdam, and G. Del Prete. 2002. Active tuberculosis in Africa

is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur J Immunol* 32:1605-1613.

104. Jung, Y. J., R. LaCourse, L. Ryan, and R. J. North. 2002. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against Mycobacterium tuberculosis lung infection in mice. *Infect Immun* 70:6436-6443.
105. North, R. J. 1998. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 113:55-58.
106. Rook, G. A., R. Hernandez-Pando, K. Dheda, and G. Teng Seah. 2004. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol* 25:483-488.
107. Mueller, D. L., M. K. Jenkins, and R. H. Schwartz. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 7:445-480.
108. Pentcheva-Hoang, T., E. Corse, and J. P. Allison. 2009. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. *Immunol Rev* 229:67-87.
109. Abdi, K., N. Singh, and P. Matzinger. 2006. T-cell control of IL-12p75 production. *Scand J Immunol* 64:83-92.
110. Corthay, A. 2006. A three-cell model for activation of naive T helper cells. *Scand J Immunol* 64:93-96.
111. Aicher, A., M. Hayden-Ledbetter, W. A. Brady, A. Pezzutto, G. Richter, D. Magaletti, S. Buckwalter, J. A. Ledbetter, and E. A. Clark. 2000. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol* 164:4689-4696.
112. Chambers, C. A. 2001. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 22:217-223.
113. Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-258.
114. Fallarino, F., U. Grohmann, C. Vacca, R. Bianchi, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. CD40 ligand and CTLA-4 are reciprocally regulated in the Th1 cell proliferative response sustained by CD8(+) dendritic cells. *J Immunol* 169:1182-1188.
115. Sridevi, K., K. Neena, K. T. Chitralekha, A. K. Arif, D. Tomar, and D. N. Rao. 2004. Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR alphabeta, TCR gammadelta) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using Mycobacterium leprae antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of Trat protein. *Int Immunopharmacol* 4:1-14.
116. Gong, J. H., M. Zhang, R. L. Modlin, P. S. Linsley, D. Iyer, Y. Lin, and P. F. Barnes. 1996. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun* 64:913-918.
117. Merlo, A., D. Saverino, C. Tenca, C. E. Grossi, S. Bruno, and E. Ciccone. 2001. CD85/LIR-1/ILT2 and CD152 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) inhibitory molecules down-regulate the cytolytic activity of human CD4+ T-cell clones specific for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 69:6022-6029.
118. Kirman, J., K. McCoy, S. Hook, M. Prout, B. Delahunt, I. Orme, A. Frank, and G. Le Gros. 1999. CTLA-4 blockade enhances the immune response induced by

mycobacterial infection but does not lead to increased protection. *Infect Immun* 67:3786-3792.

119. Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R. A. Kroczek. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263-266.
120. Swallow, M. M., J. J. Wallin, and W. C. Sha. 1999. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* 11:423-432.
121. Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, S. D. Khare, U. Sarmiento, J. Guo, T. Horan, G. Shih, M. Zhang, M. A. Coccia, T. Kohno, A. Tafuri-Bladt, D. Brankow, P. Campbell, D. Chang, L. Chiu, T. Dai, G. Duncan, G. S. Elliott, A. Hui, S. M. McCabe, S. Scully, A. Shahinian, C. L. Shaklee, G. Van, T. W. Mak, and G. Senaldi. 1999. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402:827-832.
122. Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5:1365-1369.
123. Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-1034.
124. Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11:3887-3895.
125. Latchman, Y., C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A. J. Long, J. A. Brown, R. Nunes, E. A. Greenfield, K. Bourque, V. A. Boussiotis, L. L. Carter, B. M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2:261-268.
126. Cocks, B. G., C. C. Chang, J. M. Carballido, H. Yssel, J. E. de Vries, and G. Aversa. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376:260-263.
127. Garcia, V. E., M. F. Quiroga, M. T. Ochoa, L. Ochoa, V. Pasquinelli, L. Fainboim, L. M. Olivares, R. Valdez, D. O. Sordelli, G. Aversa, R. L. Modlin, and P. A. Sieling. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. *J Immunol* 167:5719-5724.
128. Quiroga, M. F., G. J. Martinez, V. Pasquinelli, M. A. Costas, M. M. Bracco, A. Malbran, L. M. Olivares, P. A. Sieling, and V. E. Garcia. 2004. Activation of signaling lymphocytic activation molecule triggers a signaling cascade that enhances Th1 responses in human intracellular infection. *J Immunol* 173:4120-4129.
129. Pasquinelli, V., M. F. Quiroga, G. J. Martinez, L. C. Zorrilla, R. M. Musella, M. M. Bracco, L. Belmonte, A. Malbran, L. Fainboim, P. A. Sieling, and V. E. Garcia. 2004. Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol* 172:1177-1185.
130. Quiroga, M. F., V. Pasquinelli, G. J. Martinez, J. O. Jurado, L. C. Zorrilla, R. M. Musella, E. Abbate, P. A. Sieling, and V. E. Garcia. 2006. Inducible

costimulator: a modulator of IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol* 176:5965-5974.

131. Aversa, G., C. C. Chang, J. M. Carballido, B. G. Cocks, and J. E. de Vries. 1997. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 158:4036-4044.
132. Punnonen, J., B. G. Cocks, J. M. Carballido, B. Bennett, D. Peterson, G. Aversa, and J. E. de Vries. 1997. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 185:993-1004.
133. Veillette, A., Z. Dong, L. A. Perez-Quintero, M. C. Zhong, and M. E. Cruz-Munoz. 2009. Importance and mechanism of 'switch' function of SAP family adapters. *Immunol Rev* 232:229-239.
134. Bleharski, J. R., K. R. Niazi, P. A. Sieling, G. Cheng, and R. L. Modlin. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* 167:3174-3181.
135. Minagawa, H., K. Tanaka, N. Ono, H. Tatsuo, and Y. Yanagi. 2001. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol* 82:2913-2917.
136. Meroni, L., M. L. Fusi, S. Varchetta, M. Biasin, S. Rusconi, M. L. Villa, J. E. De Vries, G. Aversa, M. Galli, and M. Clerici. 1999. Altered signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) expression in HIV infection and redirection of HIV-specific responses via SLAM triggering. *Clin Immunol* 92:276-284.
137. Roncagalli, R., J. E. Taylor, S. Zhang, X. Shi, R. Chen, M. E. Cruz-Munoz, L. Yin, S. Latour, and A. Veillette. 2005. Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol* 6:1002-1010.
138. Wu, C., J. Sayos, N. Wang, D. Howie, A. Coyle, and C. Terhorst. 2000. Genomic organization and characterization of mouse SAP, the gene that is altered in X-linked lymphoproliferative disease. *Immunogenetics* 51:805-815.
139. Davidson, D., X. Shi, S. Zhang, H. Wang, M. Nemer, N. Ono, S. Ohno, Y. Yanagi, and A. Veillette. 2004. Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity* 21:707-717.
140. Endt, J., P. Eissmann, S. C. Hoffmann, S. Meinke, T. Giese, and C. Watzl. 2007. Modulation of 2B4 (CD244) activity and regulated SAP expression in human NK cells. *Eur J Immunol* 37:193-198.
141. Mikhalap, S. V., L. M. Shlapatska, O. V. Yurchenko, M. Y. Yurchenko, G. G. Berdova, K. E. Nichols, E. A. Clark, and S. P. Sidorenko. 2004. The adaptor protein SH2D1A regulates signaling through CD150 (SLAM) in B cells. *Blood* 104:4063-4070.
142. Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, H. Oettgen, J. E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395:462-469.
143. Veillette, A. 2002. The SAP family: a new class of adaptor-like molecules that regulates immune cell functions. *Sci STKE* 2002:PE8.
144. Howie, D., M. Simarro, J. Sayos, M. Guirado, J. Sancho, and C. Terhorst. 2002. Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150

(SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood* 99:957-965.

145. Latour, S., R. Roncagalli, R. Chen, M. Bakinowski, X. Shi, P. L. Schwartzberg, D. Davidson, and A. Veillette. 2003. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 5:149-154.
146. Latour, S., G. Gish, C. D. Helgason, R. K. Humphries, T. Pawson, and A. Veillette. 2001. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immunol* 2:681-690.
147. Cannons, J. L., L. J. Yu, B. Hill, L. A. Mijares, D. Dombroski, K. E. Nichols, A. Antonellis, G. A. Koretzky, K. Gardner, and P. L. Schwartzberg. 2004. SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity* 21:693-706.
148. Howie, D., J. Sayos, C. Terhorst, and M. Morra. 2000. The gene defective in X-linked lymphoproliferative disease controls T cell dependent immune surveillance against Epstein-Barr virus. *Curr Opin Immunol* 12:474-478.
149. Nichols, K. E., G. A. Koretzky, and C. H. June. 2001. SAP: natural inhibitor or grand SLAM of T cell activation? *Nat Immunol* 2:665-666.
150. Czar, M. J., E. N. Kersh, L. A. Mijares, G. Lanier, J. Lewis, G. Yap, A. Chen, A. Sher, C. S. Duckett, R. Ahmed, and P. L. Schwartzberg. 2001. Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7449-7454.
151. Chan, B., A. Lanyi, H. K. Song, J. Griesbach, M. Simarro-Grande, F. Poy, D. Howie, J. Sumegi, C. Terhorst, and M. J. Eck. 2003. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* 5:155-160.
152. Howie, D., S. Okamoto, S. Rietdijk, K. Clarke, N. Wang, C. Gullo, J. P. Bruggeman, S. Manning, A. J. Coyle, E. Greenfield, V. Kuchroo, and C. Terhorst. 2002. The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon gamma production. *Blood* 100:2899-2907.
153. Isomaki, P., G. Aversa, B. G. Cocks, R. Luukkainen, R. Saario, P. Toivanen, J. E. de Vries, and J. Punnonen. 1997. Increased expression of signaling lymphocytic activation molecule in patients with rheumatoid arthritis and its role in the regulation of cytokine production in rheumatoid synovium. *J Immunol* 159:2986-2993.
154. Carballido, J. M., G. Aversa, K. Kaltoft, B. G. Cocks, J. Punnonen, H. Yssel, K. Thestrup-Pedersen, and J. E. de Vries. 1997. Reversal of human allergic T helper 2 responses by engagement of signaling lymphocytic activation molecule. *J Immunol* 159:4316-4321.
155. Kruse, M., E. Meinl, G. Henning, C. Kuhnt, S. Berchtold, T. Berger, G. Schuler, and A. Steinkasserer. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* 167:1989-1995.
156. Wu, C., K. B. Nguyen, G. C. Pien, N. Wang, C. Gullo, D. Howie, M. R. Sosa, M. J. Edwards, P. Borrow, A. R. Satoskar, A. H. Sharpe, C. A. Biron, and C. Terhorst. 2001. SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nat Immunol* 2:410-414.
157. Newman, P. J. 1997. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 100:S25-29.
158. Elias, C. G., 3rd, J. P. Spellberg, B. Karan-Tamir, C. H. Lin, Y. J. Wang, P. J. McKenna, W. A. Muller, M. M. Zukowski, and D. P. Andrew. 1998. Ligation of

CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils. *Eur J Immunol* 28:1948-1958.

159. Ilan, N., and J. A. Madri. 2003. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol* 15:515-524.
160. Newman, P. J., and D. K. Newman. 2003. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:953-964.
161. Treutiger, C. J., A. Heddini, V. Fernandez, W. A. Muller, and M. Wahlgren. 1997. PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Nat Med* 3:1405-1408.
162. Deaglio, S., M. Morra, R. Mallone, C. M. Ausiello, E. Prager, G. Garbarino, U. Dianzani, H. Stockinger, and F. Malavasi. 1998. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol* 160:395-402.
163. Sachs, U. J., C. L. Andrei-Selmer, A. Maniar, T. Weiss, C. Paddock, V. V. Orlova, E. Y. Choi, P. J. Newman, K. T. Preissner, T. Chavakis, and S. Santoso. 2007. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J Biol Chem* 282:23603-23612.
164. Prager, E., R. Sunder-Plassmann, C. Hansmann, C. Koch, W. Holter, W. Knapp, and H. Stockinger. 1996. Interaction of CD31 with a heterophilic counterreceptor involved in downregulation of human T cell responses. *J Exp Med* 184:41-50.
165. Albelda, S. M., P. D. Oliver, L. H. Romer, and C. A. Buck. 1990. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 110:1227-1237.
166. Tang, D. G., Y. Q. Chen, P. J. Newman, L. Shi, X. Gao, C. A. Diglio, and K. V. Honn. 1993. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J Biol Chem* 268:22883-22894.
167. Lutzky, V. P., R. P. Carnevale, M. J. Alvarez, P. C. Maffia, S. I. Zittermann, O. L. Podhajcer, A. C. Issekutz, and H. E. Chuluyan. 2006. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. *J Cell Biochem* 98:1334-1350.
168. Romer, L. H., N. V. McLean, H. C. Yan, M. Daise, J. Sun, and H. M. DeLisser. 1995. IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. *J Immunol* 154:6582-6592.
169. Rival, Y., A. Del Maschio, M. J. Rabiet, E. Dejana, and A. Duperray. 1996. Inhibition of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 synthesis and leukocyte transmigration in endothelial cells by the combined action of TNF-alpha and IFN-gamma. *J Immunol* 157:1233-1241.
170. Mamdouh, Z., X. Chen, L. M. Pierini, F. R. Maxfield, and W. A. Muller. 2003. Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature* 421:748-753.
171. Muro, S., R. Wiewrodt, A. Thomas, L. Koniaris, S. M. Albelda, V. R. Muzykantov, and M. Koval. 2003. A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J Cell Sci* 116:1599-1609.
172. Demeure, C. E., D. G. Byun, L. P. Yang, N. Vezzio, and G. Delespesse. 1996. CD31 (PECAM-1) is a differentiation antigen lost during human CD4 T-cell maturation into Th1 or Th2 effector cells. *Immunology* 88:110-115.

173. Newton-Nash, D. K., and P. J. Newman. 1999. A new role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction. *J Immunol* 163:682-688.
174. Liao, F., J. Ali, T. Greene, and W. A. Muller. 1997. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Exp Med* 185:1349-1357.
175. Pinter, E., M. Barreuther, T. Lu, B. A. Imhof, and J. A. Madri. 1997. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) tyrosine phosphorylation state changes during vasculogenesis in the murine conceptus. *Am J Pathol* 150:1523-1530.
176. DeLisser, H. M., M. Christofidou-Solomidou, R. M. Strieter, M. D. Burdick, C. S. Robinson, R. S. Wexler, J. S. Kerr, C. Garlanda, J. R. Merwin, J. A. Madri, and S. M. Albelda. 1997. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 151:671-677.
177. Newman, P. J. 1999. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Invest* 103:5-9.
178. Berman, M. E., and W. A. Muller. 1995. Ligation of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol* 154:299-307.
179. Berman, M. E., Y. Xie, and W. A. Muller. 1996. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol* 156:1515-1524.
180. Nelissen, I., I. Ronsse, J. Van Damme, and G. Opdenakker. 2002. Regulation of gelatinase B in human monocytic and endothelial cells by PECAM-1 ligation and its modulation by interferon-beta. *J Leukoc Biol* 71:89-98.
181. Gao, C., W. Sun, M. Christofidou-Solomidou, M. Sawada, D. K. Newman, C. Bergom, S. M. Albelda, S. Matsuyama, and P. J. Newman. 2003. PECAM-1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial-dependent apoptosis. *Blood* 102:169-179.
182. Ferrero, C., I. Bravo, and M. R. Jimenez-Castellanos. 2003. Drug release kinetics and fronts movement studies from methyl methacrylate (MMA) copolymer matrix tablets: effect of copolymer type and matrix porosity. *J Control Release* 92:69-82.
183. Ilan, N., A. Mohsenin, L. Cheung, and J. A. Madri. 2001. PECAM-1 shedding during apoptosis generates a membrane-anchored truncated molecule with unique signaling characteristics. *FASEB J* 15:362-372.
184. Scimone, M. L., V. P. Lutzky, S. I. Zittermann, P. Maffia, C. Jancic, F. Buzzola, A. C. Issekutz, and H. E. Chuluyan. 2005. Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells. *Immunology* 114:375-385.
185. Saito, T. 1998. Negative regulation of T cell activation. *Curr Opin Immunol* 10:313-321.
186. Prager, E., G. Staffler, O. Majdic, M. Saemann, S. Godar, G. Zlabinger, and H. Stockinger. 2001. Induction of hyporesponsiveness and impaired T lymphocyte activation by the CD31 receptor:ligand pathway in T cells. *J Immunol* 166:2364-2371.
187. Shinohara, T., M. Taniwaki, Y. Ishida, M. Kawaichi, and T. Honjo. 1994. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* 23:704-706.

188. Shlapatska, L. M., S. V. Mikhalap, A. G. Berdova, O. M. Zelensky, T. J. Yun, K. E. Nichols, E. A. Clark, and S. P. Sidorenko. 2001. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol* 166:5480-5487.
189. Wan, B., H. Nie, A. Liu, G. Feng, D. He, R. Xu, Q. Zhang, C. Dong, and J. Z. Zhang. 2006. Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 177:8844-8850.
190. Nielsen, C., L. Ohm-Laursen, T. Barington, S. Husby, and S. T. Lillevang. 2005. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell Immunol* 235:109-116.
191. Agata, Y., A. Kawasaki, H. Nishimura, Y. Ishida, T. Tsubata, H. Yagita, and T. Honjo. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8:765-772.
192. Kinter, A. L., E. J. Godbout, J. P. McNally, I. Sereti, G. A. Roby, M. A. O'Shea, and A. S. Fauci. 2008. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* 181:6738-6746.
193. Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-687.
194. Day, C. L., D. E. Kaufmann, P. Kiepiela, J. A. Brown, E. S. Moodley, S. Reddy, E. W. Mackey, J. D. Miller, A. J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E. J. Wherry, H. M. Coovadia, P. J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G. J. Freeman, and B. D. Walker. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443:350-354.
195. Petrovas, C., J. P. Casazza, J. M. Brenchley, D. A. Price, E. Gostick, W. C. Adams, M. L. Precopio, T. Schacker, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup. 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 203:2281-2292.
196. Ishida, M., Y. Iwai, Y. Tanaka, T. Okazaki, G. J. Freeman, N. Minato, and T. Honjo. 2002. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett* 84:57-62.
197. Yamazaki, T., H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll, K. Okumura, M. Azuma, and H. Yagita. 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169:5538-5545.
198. Liang, S. C., Y. E. Latchman, J. E. Buhlmann, M. F. Tomczak, B. H. Horwitz, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2003. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol* 33:2706-2716.
199. Nakae, S., H. Suto, M. Iikura, M. Kakurai, J. D. Sedgwick, M. Tsai, and S. J. Galli. 2006. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J Immunol* 176:2238-2248.
200. Zhong, X., J. R. Tumang, W. Gao, C. Bai, and T. L. Rothstein. 2007. PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *Eur J Immunol* 37:2405-2410.

201. Okazaki, T., A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, and T. Honjo. 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13866-13871.
202. Chemnitz, J. M., R. V. Parry, K. E. Nichols, C. H. June, and J. L. Riley. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 173:945-954.
203. Parry, R. V., J. M. Chemnitz, K. A. Frauwirth, A. R. Lanfranco, I. Braunstein, S. V. Kobayashi, P. S. Linsley, C. B. Thompson, and J. L. Riley. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25:9543-9553.
204. Pentcheva-Hoang, T., L. Chen, D. M. Pardoll, and J. P. Allison. 2007. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17765-17770.
205. Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11:141-151.
206. Nishimura, H., T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Nakatani, M. Hara, A. Matsumori, S. Sasayama, A. Mizoguchi, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291:319-322.
207. Wang, J., T. Yoshida, F. Nakaki, H. Hiai, T. Okazaki, and T. Honjo. 2005. Establishment of NOD-Pdcd1-/- mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11823-11828.
208. Latchman, Y. E., S. C. Liang, Y. Wu, T. Chernova, R. A. Sobel, M. Klemm, V. K. Kuchroo, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2004. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10691-10696.
209. Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, D. B. Flies, J. M. van Deursen, and L. Chen. 2004. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* 20:327-336.
210. Zhang, Y., Y. Chung, C. Bishop, B. Daugherty, H. Chute, P. Holst, C. Kurahara, F. Lott, N. Sun, A. A. Welcher, and C. Dong. 2006. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11695-11700.
211. Guleria, I., A. Khosroshahi, M. J. Ansari, A. Habicht, M. Azuma, H. Yagita, R. J. Noelle, A. Coyle, A. L. Mellor, S. J. Khoury, and M. H. Sayegh. 2005. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med* 202:231-237.
212. Ito, T., T. Ueno, M. R. Clarkson, X. Yuan, M. M. Jurewicz, H. Yagita, M. Azuma, A. H. Sharpe, H. Auchincloss, Jr., M. H. Sayegh, and N. Najafian. 2005. Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo. *J Immunol* 174:6648-6656.
213. Sandner, S. E., M. R. Clarkson, A. D. Salama, A. Sanchez-Fueyo, C. Domenig, A. Habicht, N. Najafian, H. Yagita, M. Azuma, L. A. Turka, and M. H. Sayegh. 2005. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. *J Immunol* 174:3408-3415.
214. Seo, S. K., H. M. Seo, H. Y. Jeong, I. W. Choi, Y. M. Park, H. Yagita, L. Chen, and I. H. Choi. 2006. Co-inhibitory role of T-cell-associated B7-H1 and B7-DC in the T-cell immune response. *Immunol Lett* 102:222-228.

215. Blazar, B. R., B. M. Carreno, A. Panoskaltsis-Mortari, L. Carter, Y. Iwai, H. Yagita, H. Nishimura, and P. A. Taylor. 2003. Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* 171:1272-1277.
216. Matsumoto, K., H. Inoue, T. Nakano, M. Tsuda, Y. Yoshiura, S. Fukuyama, F. Tsushima, T. Hoshino, H. Aizawa, H. Akiba, D. Pardoll, N. Hara, H. Yagita, M. Azuma, and Y. Nakanishi. 2004. B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* 172:2530-2541.
217. Oflazoglu, E., D. A. Swart, P. Anders-Bartholo, H. K. Jessup, A. M. Norment, W. A. Lawrence, K. Brasel, J. E. Tocker, T. Horan, A. A. Welcher, and D. R. Fitzpatrick. 2004. Paradoxical role of programmed death-1 ligand 2 in Th2 immune responses in vitro and in a mouse asthma model in vivo. *Eur J Immunol* 34:3326-3336.
218. Fukushima, A., T. Yamaguchi, M. Azuma, H. Yagita, and H. Ueno. 2006. Involvement of programmed death-ligand 2 (PD-L2) in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Br J Ophthalmol* 90:1040-1045.
219. Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8:793-800.
220. Iwai, Y., M. Ishida, Y. Tanaka, T. Okazaki, T. Honjo, and N. Minato. 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12293-12297.
221. Hamanishi, J., M. Mandai, M. Iwasaki, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Higuchi, H. Yagi, K. Takakura, N. Minato, T. Honjo, and S. Fujii. 2007. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3360-3365.
222. Thompson, R. H., M. D. Gillett, J. C. Cheville, C. M. Lohse, H. Dong, W. S. Webster, L. Chen, H. Zincke, M. L. Blute, B. C. Leibovich, and E. D. Kwon. 2005. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 104:2084-2091.
223. Thompson, R. H., M. D. Gillett, J. C. Cheville, C. M. Lohse, H. Dong, W. S. Webster, K. G. Krejci, J. R. Lobo, S. Sengupta, L. Chen, H. Zincke, M. L. Blute, S. E. Strome, B. C. Leibovich, and E. D. Kwon. 2004. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17174-17179.
224. Thompson, R. H., S. M. Kuntz, B. C. Leibovich, H. Dong, C. M. Lohse, W. S. Webster, S. Sengupta, I. Frank, A. S. Parker, H. Zincke, M. L. Blute, T. J. Sebo, J. C. Cheville, and E. D. Kwon. 2006. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res* 66:3381-3385.
225. Inman, B. A., T. J. Sebo, X. Frigola, H. Dong, E. J. Bergstralh, I. Frank, Y. Fradet, L. Lacombe, and E. D. Kwon. 2007. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* 109:1499-1505.
226. Nakanishi, J., Y. Wada, K. Matsumoto, M. Azuma, K. Kikuchi, and S. Ueda. 2007. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor

grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother* 56:1173-1182.

227. Nomi, T., M. Sho, T. Akahori, K. Hamada, A. Kubo, H. Kanehiro, S. Nakamura, K. Enomoto, H. Yagita, M. Azuma, and Y. Nakajima. 2007. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 13:2151-2157.
228. Konishi, J., K. Yamazaki, M. Azuma, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, and M. Nishimura. 2004. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 10:5094-5100.
229. Wu, C., Y. Zhu, J. Jiang, J. Zhao, X. G. Zhang, and N. Xu. 2006. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem* 108:19-24.
230. Azuma, T., S. Yao, G. Zhu, A. S. Flies, S. J. Flies, and L. Chen. 2008. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 111:3635-3643.
231. Liu, X., J. X. Gao, J. Wen, L. Yin, O. Li, T. Zuo, T. F. Gajewski, Y. X. Fu, P. Zheng, and Y. Liu. 2003. B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism. *J Exp Med* 197:1721-1730.
232. Shin, T., K. Yoshimura, E. B. Crafton, H. Tsuchiya, F. Housseau, H. Koseki, R. D. Schulick, L. Chen, and D. M. Pardoll. 2005. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 201:1531-1541.
233. Tamura, H., H. Dong, G. Zhu, G. L. Sica, D. B. Flies, K. Tamada, and L. Chen. 2001. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood* 97:1809-1816.
234. Tseng, S. Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J. E. Slansky, S. I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D. M. Pardoll, and H. Tsuchiya. 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193:839-846.
235. Curiel, T. J., S. Wei, H. Dong, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, R. Krzysiek, K. L. Knutson, B. Daniel, M. C. Zimmermann, O. David, M. Burow, A. Gordon, N. Dhurandhar, L. Myers, R. Berggren, A. Hemminki, R. D. Alvarez, D. Emilie, D. T. Curiel, L. Chen, and W. Zou. 2003. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 9:562-567.
236. Hirano, F., K. Kaneko, H. Tamura, H. Dong, S. Wang, M. Ichikawa, C. Rietz, D. B. Flies, J. S. Lau, G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 2005. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 65:1089-1096.
237. Strome, S. E., H. Dong, H. Tamura, S. G. Voss, D. B. Flies, K. Tamada, D. Salomao, J. Cheville, F. Hirano, W. Lin, J. L. Kasperbauer, K. V. Ballman, and L. Chen. 2003. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63:6501-6505.
238. Berger, R., R. Rotem-Yehudar, G. Slama, S. Landes, A. Kneller, M. Leiba, M. Koren-Michowitz, A. Shimoni, and A. Nagler. 2008. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 14:3044-3051.
239. Boni, C., P. Fisicaro, C. Valdatta, B. Amadei, P. Di Vincenzo, T. Giuberti, D. Laccabue, A. Zerbini, A. Cavalli, G. Missale, A. Bertoletti, and C. Ferrari. 2007.

Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 81:4215-4225.

240. Jeong, H. Y., Y. J. Lee, S. K. Seo, S. W. Lee, S. J. Park, J. N. Lee, H. S. Sohn, S. Yao, L. Chen, and I. Choi. 2008. Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatitis C infection. *J Leukoc Biol* 83:755-764.
241. Penna, A., M. Pilli, A. Zerbini, A. Orlandini, S. Mezzadri, L. Sacchelli, G. Missale, and C. Ferrari. 2007. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 45:588-601.
242. Radziewicz, H., C. C. Ibegbu, M. L. Fernandez, K. A. Workowski, K. Obideen, M. Wehbi, H. L. Hanson, J. P. Steinberg, D. Masopust, E. J. Wherry, J. D. Altman, B. T. Rouse, G. J. Freeman, R. Ahmed, and A. Grakoui. 2007. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol* 81:2545-2553.
243. Urbani, S., B. Amadei, D. Tola, M. Massari, S. Schivazappa, G. Missale, and C. Ferrari. 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 80:11398-11403.
244. Jun, H., S. K. Seo, H. Y. Jeong, H. M. Seo, G. Zhu, L. Chen, and I. H. Choi. 2005. B7-H1 (CD274) inhibits the development of herpetic stromal keratitis (HSK). *FEBS Lett* 579:6259-6264.
245. Das, S., G. Suarez, E. J. Beswick, J. C. Sierra, D. Y. Graham, and V. E. Reyes. 2006. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during Helicobacter pylori infection. *J Immunol* 176:3000-3009.
246. Hamilton, J. K., L. A. Paquin, J. L. Sullivan, H. S. Maurer, F. G. Cruzi, A. J. Provisor, C. P. Steuber, E. Hawkins, D. Yawn, J. A. Cornet, K. Clausen, G. Z. Finkelstein, B. Landing, M. Grunnet, and D. T. Purtilo. 1980. X-linked lymphoproliferative syndrome registry report. *J Pediatr* 96:669-673.
247. de la Barrera, S., M. Aleman, R. Musella, P. Schierloh, V. Pasquinelli, V. Garcia, E. Abbate, and C. Sasiain Mdel. 2004. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 138:128-138.
248. Betts, M. R., J. M. Brenchley, D. A. Price, S. C. De Rosa, D. C. Douek, M. Roederer, and R. A. Koup. 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281:65-78.
249. Quiroga, M. F., J. O. Jurado, G. J. Martinez, V. Pasquinelli, R. M. Musella, E. Abbate, A. C. Issekutz, M. M. Bracco, A. Malbran, P. A. Sieling, E. Chuluyan, and V. E. Garcia. 2007. Cross-talk between CD31 and the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein during interferon- gamma production against Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* 196:1369-1378.
250. Carter, L., L. A. Fouser, J. Jussif, L. Fitz, B. Deng, C. R. Wood, M. Collins, T. Honjo, G. J. Freeman, and B. M. Carreno. 2002. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 32:634-643.

251. Sharpe, A. H., E. J. Wherry, R. Ahmed, and G. J. Freeman. 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8:239-245.
252. Chan, E. D., J. Chan, and N. W. Schluger. 2001. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis?Current knowledge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:606-612.
253. Dorman, S. E., and S. M. Holland. 2000. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:321-333.
254. Bennett, F., D. Luxenberg, V. Ling, I. M. Wang, K. Marquette, D. Lowe, N. Khan, G. Veldman, K. A. Jacobs, V. E. Valge-Archer, M. Collins, and B. M. Carreno. 2003. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* 170:711-718.
255. Ellner, J. J., P. F. Barnes, R. S. Wallis, and R. L. Modlin. 1988. The immunology of tuberculous pleurisy. *Semin Respir Infect* 3:335-342.
256. Loke, P., and J. P. Allison. 2003. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5336-5341.
257. Chen, L. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4:336-347.
258. Butte, M. J., M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27:111-122.
259. Bukczynski, J., T. Wen, C. Wang, N. Christie, J. P. Routy, M. R. Boulassel, C. M. Kovacs, K. S. Macdonald, M. Ostrowski, R. P. Sekaly, N. F. Bernard, and T. H. Watts. 2005. Enhancement of HIV-specific CD8 T cell responses by dual costimulation with CD80 and CD137L. *J Immunol* 175:6378-6389.
260. Lee, S. W., Y. Park, A. Song, H. Cheroutre, B. S. Kwon, and M. Croft. 2006. Functional dichotomy between OX40 and 4-1BB in modulating effector CD8 T cell responses. *J Immunol* 177:4464-4472.
261. Dawicki, W., E. M. Bertram, A. H. Sharpe, and T. H. Watts. 2004. 4-1BB and OX40 act independently to facilitate robust CD8 and CD4 recall responses. *J Immunol* 173:5944-5951.
262. Jurado, J. O., I. B. Alvarez, V. Pasquinelli, G. J. Martinez, M. F. Quiroga, E. Abbate, R. M. Musella, H. E. Chuluyan, and V. E. Garcia. 2008. Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol* 181:116-125.
263. Bai, H., J. Cheng, X. Gao, A. G. Joyee, Y. Fan, S. Wang, L. Jiao, Z. Yao, and X. Yang. 2009. IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function. *J Immunol* 183:5886-5895.
264. Ma, C. S., K. E. Nichols, and S. G. Tangye. 2007. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol* 25:337-379.
265. Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23:515-548.
266. Tomasello, E., M. Blery, F. Vely, and E. Vivier. 2000. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol* 12:139-147.

267. Castro, A. G., T. M. Hauser, B. G. Cocks, J. Abrams, S. Zurawski, T. Churakova, F. Zonin, D. Robinson, S. G. Tangye, G. Aversa, K. E. Nichols, J. E. de Vries, L. L. Lanier, and A. O'Garra. 1999. Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 163:5860-5870.
268. Sidorenko, S. P., and E. A. Clark. 2003. The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol* 4:19-24.
269. Garcia, V. E., P. A. Sieling, J. Gong, P. F. Barnes, K. Uyemura, Y. Tanaka, B. R. Bloom, C. T. Morita, and R. L. Modlin. 1997. Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J Immunol* 159:1328-1335.
270. Morra, M., D. Howie, M. S. Grande, J. Sayos, N. Wang, C. Wu, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol* 19:657-682.
271. Katamura, K., T. Fukui, T. Kiyomasu, K. Ohmura, J. Iio, and H. Ueno. 2000. Regulation of CD31 expression and interleukin-4 production by human cord blood CD4+ T cells with interleukin-4 and interleukin-7. *Pediatr Int* 42:126-133.
272. Tangye, S. G., S. Lazetic, E. Woollatt, G. R. Sutherland, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1999. Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J Immunol* 162:6981-6985.
273. Loke, P., and J. P. Allison. 2004. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. *Arthritis Res Ther* 6:208-214.
274. Boettler, T., E. Panther, B. Bengsch, N. Nazarova, H. C. Spangenberg, H. E. Blum, and R. Thimme. 2006. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 80:3532-3540.
275. Cohen, N., J. Morisset, and D. Emilie. 2004. Induction of tolerance by Porphyromonas gingivalis on APCS: a mechanism implicated in periodontal infection. *J Dent Res* 83:429-433.
276. Sable, S. B., R. Kumar, M. Kalra, I. Verma, G. K. Khuller, K. Dobos, and J. T. Belisle. 2005. Peripheral blood and pleural fluid mononuclear cell responses to low-molecular-mass secretory polypeptides of Mycobacterium tuberculosis in human models of immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 73:3547-3558.
277. Flies, D. B., and L. Chen. 2007. The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity. *J Immunother* 30:251-260.
278. Okamoto, M., Y. Hasegawa, T. Hara, N. Hashimoto, K. Imaizumi, K. Shimokata, and T. Kawabe. 2005. T-helper type 1/T-helper type 2 balance in malignant pleural effusions compared to tuberculous pleural effusions. *Chest* 128:4030-4035.
279. Rodig, N., T. Ryan, J. A. Allen, H. Pang, N. Grabie, T. Chernova, E. A. Greenfield, S. C. Liang, A. H. Sharpe, A. H. Lichtman, and G. J. Freeman. 2003. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. *Eur J Immunol* 33:3117-3126.
280. Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M. R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-

specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12:1198-1202.

281. Maier, H., M. Isogawa, G. J. Freeman, and F. V. Chisari. 2007. PD-1:PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8+ T lymphocytes in the liver. *J Immunol* 178:2714-2720.
282. Wolf, A. J., L. Desvignes, B. Linas, N. Banaiee, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. 2008. Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med* 205:105-115.
283. Alfaro, C., O. Murillo, I. Tirapu, A. Azpilicueta, E. Huarte, A. Arina, L. Arribillaga, J. L. Perez-Gracia, M. Bendandi, J. Prieto, J. J. Lasarte, and I. Melero. 2006. [The immunotherapy potential of agonistic anti-CD137 (4-1BB) monoclonal antibodies for malignancies and chronic viral diseases]. *An Sist Sanit Navar* 29:77-96.
284. Umemura, M., A. Yahagi, S. Hamada, M. D. Begum, H. Watanabe, K. Kawakami, T. Suda, K. Sudo, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. 2007. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol* 178:3786-3796.
285. Dragon, S., A. S. Saffar, L. Shan, and A. S. Gounni. 2008. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol* 45:160-168.
286. Zelante, T., A. De Luca, P. Bonifazi, C. Montagnoli, S. Bozza, S. Moretti, M. L. Belladonna, C. Vacca, C. Conte, P. Mosci, F. Bistoni, P. Puccetti, R. A. Kastelein, M. Kopf, and L. Romani. 2007. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* 37:2695-2706.
287. Brucklacher-Waldert, V., K. Steinbach, M. Lioznov, M. Kolster, C. Holscher, and E. Tolosa. 2009. Phenotypical characterization of human Th17 cells unambiguously identified by surface IL-17A expression. *J Immunol* 183:5494-5501.
288. Stumhofer, J. S., J. Silver, and C. A. Hunter. 2007. Negative regulation of Th17 responses. *Semin Immunol* 19:394-399.
289. Bouguermouh, S., G. Fortin, N. Baba, M. Rubio, and M. Sarfati. 2009. CD28 co-stimulation down regulates Th17 development. *PLoS One* 4:e5087.
290. Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall, and A. M. Cooper. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 8:369-377.
291. Cruz, A., S. A. Khader, E. Torrado, A. Fraga, J. E. Pearl, J. Pedrosa, A. M. Cooper, and A. G. Castro. 2006. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol* 177:1416-1420.
292. Murphy, C. A., C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick, and D. J. Cua. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198:1951-1957.