



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral:***

***“IMPACTO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN LA RESPUESTA  
INNATA DEL EPITELIO BRONQUIAL HUMANO”.***

---

***Tesista: Lic. Denise Kviatcovsky***

***Directora: Dra. Silvia Susana de la Barrera***

***Co-director: Dr. Carlos Alberto Fossati***

***Año: 2018***

***A mi padre, que  
me ha dado todo***

*A Silvia, mi directora, por haberme dado la posibilidad de crecer profesionalmente, darme libertad, apoyarme y creer en mí en cada paso de este camino.*

*A María del Carmen, por confiar en mí sin siquiera conocerme, por haberme hecho parte de su grupo y ser muchas veces mi psicóloga personal y profesional.*

*Al Dr. Fossati, por la paciencia, por darme siempre una mano con los trámites en la facu y haber leído y corregido tan detalladamente esta tesis.*

*A Lulu, mi compañera, confidente, cómplice y amiga. Gracias por compartir conmigo todos los días y ser incondicional. Definitivamente, nada de lo que logré hubiera sido lo mismo sin vos y tu apoyo.*

*A cada uno de mis compañeros de "Inmuno I" por compartir el día a día, charlas, almuerzos y mates. Por hacer que los días en el labo sean más entretenidos y divertidos.*

*A Evelita, por recibirnos con una sonrisa siempre, por sus palabras y contención.*

*A mi gran amigo Leito, por las risas, los momentos inolvidables compartidos, las charlas y los consejos que van a quedar siempre en mi corazón y en mi memoria. Te extraño infinitamente!*

*A Agus por tu amistad, por bancarme siempre y estar ahí cuando más te necesité. Haber transitado juntas esta etapa y que ya haya terminado me resulta imposible de creer.*

*A Agos por las tardes de verano en la terraza y las charlas divertidas. Por la amistad que construimos y que prevalece a pesar de la distancia.*

*A los "chicos de Trombosis", porque fueron como mi segundo lab, por las charlas y los momentos de distracción entre cervecitas, mates y tereré.*

*A mis amigos de la vida, Juan, Sersh y la Mexi, que me conocen más que nadie, por ser incondicionales y acompañarme siempre en cada etapa de mi vida.*

*A Javi, mi compañero de la vida. Por apoyarme en estos momentos de cambio y transición estando siempre al lado mío con una sonrisa. Por la felicidad y la paz que me transmitís todos los días.*

*A mi familia, por su eterno apoyo. Por estar en los momentos más difíciles y ayudarme a salir adelante siempre.*

---

**ÍNDICE DE CONTENIDO**

Abreviaturas.....	1
Resumen .....	3
Introducción .....	6
La Tuberculosis.....	7
Microbiología del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ( <i>Mtb</i> ) .....	9
Variabilidad genética del <i>Mtb</i> .....	11
Tratamiento.....	13
La tuberculosis resistente a drogas.....	14
Emergencia .....	14
La tuberculosis multirresistente a drogas en Argentina.....	15
Inmunología de la tuberculosis.....	17
La respuesta inmune contra <i>Mtb</i> .....	17
El epitelio pulmonar humano.....	20
Estructura y función del epitelio pulmonar humano.....	20
Epitelio bronquial .....	23
Establecimiento de la infección por <i>Mtb</i> en el tracto respiratorio.....	25
Los neutrófilos y su rol en la respuesta inmune frente a <i>Mtb</i> .....	28
Interacción entre el epitelio pulmonar y los neutrófilos .....	33
Objetivos.....	34
Objetivo general.....	35
Objetivos específicos .....	36
Materiales y Métodos.....	37
Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	38
Línea celular del epitelio bronquial humano: Calu-6 .....	39
Infecciones de Calu-6 con cepas de <i>Mtb</i> .....	39

---

Obtención de imágenes de Calu-6 infectadas con H37Rv y M por microscopía confocal .....	40
Determinación de unidades formadoras de colonias.....	41
Obtención de medios condicionados provenientes de Calu-6 infectadas.....	42
Depleción de TNF- $\alpha$ en H37Rv-MC .....	42
Determinación de factores solubles secretados.....	42
Determinación de actividad metaloproteínasa.....	43
Secreción de lactato deshidrogenasa mitocondrial .....	44
Análisis fenotípico de células Calu-6 por citometría de flujo.....	44
Detección de apoptosis/necrosis inducida por <i>Mtb</i> sobre Calu-6 .....	45
Neutrófilos (PMN).....	46
Dadores sanos.....	46
Purificación de PMN a partir de sangre periférica .....	46
Cultivo de PMN con medios condicionados de Calu-6.....	46
Determinación de la expresión de CD11b en PMN .....	47
Estallido respiratorio: producción de especies reactivas del oxígeno.....	47
Ensayo de sobrevivencia celular: cuantificación de apoptosis por microscopía de fluorescencia .....	48
Ensayo de formación de trampas extracelulares de neutrófilos .....	48
Determinación de P-p38 intracitoplasmática en PMN .....	50
Ensayo de fagocitosis en PMN .....	50
Ensayo de quimiotaxis de PMN .....	51
Determinación de entrada y replicación de H37Rv en PMN.....	52
Detección de apoptosis/necrosis inducida por H37Rv sobre PMN.....	52
Generación de medio condicionado de PMN infectados con H37Rv.....	53
Determinación de secreción de lactato deshidrogenasa por PMN .....	53
Actividad Mieloperoxidasa .....	54
Determinación de IL-8 secretado por PMN .....	54
Medida de la producción de óxido nítrico en sobrenadantes de PMN.....	55

---

Análisis estadístico.....	55
Resultados.....	56
PARTE I: Efecto directo de las cepas H37Rv y M sobre el epitelio bronquial humano.	
La cepa M es menos efectiva para invadir pero sobrevive dentro del epitelio.....	57
Las cepas de <i>Mtb</i> no inducen apoptosis/necrosis ni alteran la permeabilidad celular en Calu-6.....	58
Las cepas de <i>Mtb</i> no alteran la expresión de receptores de superficie en Calu-6.	60
La cepa M disminuye la secreción de TNF- $\alpha$ y GM-CSF e induce bajos niveles de secreción de IL-8 por Calu-6.....	61
La cepa M induce pobre actividad metaloproteinasa sobre Calu-6. ....	63
PARTE II: Alteración de las funciones efectoras de los neutrófilos en el contexto de la infección con <i>Mtb</i> .	
Efecto de la capacidad quimioattractante del medio condicionado derivado de Calu-6 infectadas con la cepa M sobre los PMN.....	65
Los medios condicionados alteran la activación de PMN inducida por i-H37Rv... ..	66
El medio condicionado derivado de Calu-6 infectadas con la cepa M no genera un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno inducida por i-H37Rv en PMN.....	68
Fosforilación de la p38 MAPK.....	69
Impacto de los medios condicionados sobre la fagocitosis de i-H37Rv en PMN.. ..	70
Influencia de los medios condicionados sobre la formación de trampas extracelulares de neutrófilos .....	72
El M-MC induce un aumento en la replicación intracelular de H37Rv en PMN.....	73
Efecto de los medios condicionados sobre la muerte de PMN infectados con H37Rv .....	74
Impacto de los medios condicionados sobre la producción de NO, MPO y secreción de IL-8 luego de la infección por <i>Mtb</i> . ....	77
Discusión y Conclusiones .....	80
Anexo .....	93
Bibliografía.....	96

---

**ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>AG</b>	arabinogalactano
<b>BCG</b>	bacilo de Calmette-Guérin ( <i>M. Bovis</i> )
<b>BSA</b>	albúmina sérica bovina
<b>CD</b>	células dendríticas
<b>CMH</b>	complejo mayor de histocompatibilidad
<b>DHR</b>	dihidrorodamina 123
<b>EA</b>	epitelio alveolar
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMB</b>	etambutol
<b>EROs</b>	especies reactivas del oxígeno
<b>FACS</b>	citometría de flujo
<b>fMLP</b>	N-Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (del inglés: <i>N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine</i> )
<b>GM-CSF</b>	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés: <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>i-H37Rv</b>	H37Rv gamma irradiada
<b>IL</b>	interleuquina
<b>INH</b>	isoniazida
<b>LAM</b>	Latino-Americana-Mediterránea
<b>LDH</b>	lactato deshidrogenasa mitocondrial
<b>LM</b>	lipomananos
<b>M</b>	cepa Muñiz
<b>MA</b>	macrófagos alveolares
<b>Mac</b>	macrófagos
<b>mAG</b>	ácido micólico esterificado con AG
<b>ManLAM</b>	manosa lipoarabinomanano
<b>MAPK</b>	del inglés: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
<b>MC</b>	medio condicionado
<b>MDR</b>	multirresistente a drogas
<b>MMP</b>	metaloproteinasa
<b>MOI</b>	multiplicidad de infección
<b>MPO</b>	mieloperoxidasa
<b>MR</b>	receptor de manosa

<b>Mtb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NETs</b>	trampas extracelulares de neutrófilos
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>OADC</b>	oleico-albúmina-dextrosa-catalasa
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAMPs</b>	patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PBS</b>	<i>buffer</i> fosfato salino
<b>PFA</b>	paraformaldehído
<b>PIMs</b>	fosfatidil-mio-inositol manósido
<b>PMA</b>	acetato forbol mirístico (del inglés: <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i> )
<b>PMN</b>	neutrófilos
<b>PTG</b>	peptidoglicano
<b>PZA</b>	pirazinamida
<b>RIF</b>	rifampicina
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>SF</b>	solución fisiológica
<b>SFB</b>	suero fetal bovino
<b>SNP</b>	polimorfismo de nucleótidos únicos
<b>SP</b>	sangre periférica
<b>TB</b>	tuberculosis
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	factor de crecimiento tranformante beta (del inglés: <i>Transforming growth factor-beta</i> )
<b>TLRs</b>	receptores tipo <i>Toll</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	factor de necrosis tumoral (del inglés: <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> )
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colonias
<b>VIH</b>	virus de inmunodeficiencia humana
<b>XDR</b>	extensivamente resistente a drogas

**RESUMEN**

En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos demostrado que la cepa M de *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* multirresistente a drogas prevalente en Argentina, ha montado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador. Lo que indicaría que dicha cepa podría haber desarrollado mecanismos de evasión para permanecer invisible a los mecanismos de eliminación bacteriana del hospedador, lo cual explicaría su éxito epidemiológico.

El rol del epitelio bronquial humano en el contexto de la infección por *Mtb* aún resulta desconocido así como también su interacción con los neutrófilos (PMN) en estas mismas condiciones. En este trabajo de tesis, nos propusimos evaluar si las cepas de *Mtb* M y la de referencia en el laboratorio, H37Rv son capaces de invadir y replicar dentro de la línea celular del epitelio bronquial humano Calu-6 y si el epitelio infectado con las mismas podría alterar las respuestas funcionales de los PMN, unas de las primeras células de la inmunidad innata en llegar al pulmón.

Nuestros resultados demuestran que la cepa M, a pesar de ser una cepa de menor crecimiento intracelular que la H37Rv, infecta y es capaz de sobrevivir dentro de Calu-6 sin promover la muerte celular, y que ambas cepas difieren en su capacidad para inducir la respuesta innata del epitelio bronquial. Demostramos que la interacción directa de *Mtb* con el epitelio bronquial induce la secreción diferencial de dos metaloproteinasas (MMPs) implicadas en la patología de la tuberculosis, MMP-2 y MMP-9, y que ambas se encontraron significativamente disminuidas luego de la infección con la cepa M en comparación con H37Rv. Además, contrariamente a lo observado con H37Rv, la cepa M disminuye notablemente la capacidad de secreción de la citoquina TNF- $\alpha$  y el factor de crecimiento GM-CSF con respecto al epitelio no infectado y es pobre inductora de la quimioquina IL-8. En conjunto, estos resultados demuestran que el genotipo bacteriano podría alterar la migración y activación de las células inmunocompetentes que arriban al compartimento bronquial infectado.

Paralelamente, evaluamos si los medios condicionados derivados de las Calu-6 infectadas con *Mtb* podrían ejercer en forma indirecta algún efecto sobre células de la respuesta inmune innata como los PMN, que son los primeros en arribar al sitio de infección, observamos que el medio condicionado (MC) derivado de Calu-6 infectadas con la cepa M (M-MC) no fue capaz de atraer a los PMN, lo cual se correlaciona con los bajos niveles de IL-8 detectados en dicho medio comparado con el derivado de la infección por H37Rv (H37Rv-MC). Además, el pre-tratamiento de los PMN con M-MC alteró la activación de los PMN en respuesta a H37Rv gamma irradiada (i-H37Rv), a juzgar por la ausencia de un aumento de la expresión del receptor CD11b y la baja producción de especies reactivas del oxígeno (EROs). El agregado exógeno de TNF- $\alpha$  a M-MC o bien su depleción en H37Rv-MC demuestra que la incapacidad de M-MC para pre-activar al PMN estaría asociada a los bajos niveles de TNF- $\alpha$ . Interesantemente y en correlación con lo mencionado, la fosforilación de la p38 *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) fue menor en los PMN tratados con el M-MC respecto a aquellos tratados con H37Rv-MC, hecho que podría explicar la pobre respuesta observada de los PMN pre-activados con M-MC ante un segundo estímulo empleado tal como i-H37Rv. En la misma línea, el M-MC fue el menor inductor de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) lo cual se reflejó también en la cuantificación del ADN liberado en comparación con H37Rv-MC. Llamativamente, observamos un incremento en la replicación de H37Rv en los PMN tratados con M-MC que podría atribuirse a la baja producción de especies reactivas del nitrógeno y de EROs; este hecho contribuiría a una mayor diseminación de la micobacteria tras la muerte de los PMN. Por otra lado, los PMN pre-tratados con M-MC fueron capaces de secretar mayores niveles de IL-8 en respuesta a la infección que aquellos tratados con H37Rv-MC, lo que permitiría sostener el reclutamiento de más PMN además de otras células inmunocompetentes al sitio de infección a pesar del pobre poder quimioattractante del epitelio infectado con la cepa M. De esta manera, nuestros resultados indican que aún a una baja tasa de invasión/replicación dentro del epitelio

bronquial humano, la cepa M induce la secreción de factores solubles que alteran el diálogo entre estas células no fagocíticas y los PMN, representando así un posible mecanismo de evasión desarrollado por la cepa M para persistir en el huésped. Estos datos proveen nuevas perspectivas y conocimiento acerca del papel que juega el epitelio bronquial luego de la infección con la cepa M.

# **INTRODUCCIÓN**

## LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica que aqueja a la humanidad desde la antigüedad. Si bien ha sido estudiada desde la antigua Grecia, el agente etiológico fue descubierto recién en 1882 por el microbiólogo alemán Robert Koch quien advirtió que el microorganismo patogénico *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) era el causante de la enfermedad [1].

La transmisión del bacilo *Mtb* ocurre a través de microgotas de aerosol generadas por una persona portadora activa de la enfermedad, las cuales son inhaladas e ingresan a las vías respiratorias del nuevo hospedero [2]. Aunque cualquier órgano del cuerpo puede estar comprometido, el pulmón sigue siendo el órgano más comúnmente afectado por esta enfermedad provocando principalmente tos intensa, fiebre y dolores en el pecho [3], [4].

La mayoría de los individuos infectados son capaces de montar una respuesta inmune inicial eficiente frente a la infección, dentro de los cuales el 90% desarrollará una infección latente a lo largo de la vida, esto implica que no presentan síntomas ni transmiten la enfermedad a otros [2], [4] y aproximadamente el 10% restante podrá eliminar la bacteria por completo. Sin embargo, individuos inmunocomprometidos o aquellos infectados con HIV, presentan mayor riesgo de que la infección latente pueda progresar hacia un estado activo [5] lo cual dará lugar a manifestaciones clínicas y el consiguiente desarrollo de la enfermedad (Figura 1).

A pesar de ser actualmente una enfermedad prevenible y curable, aún continúa siendo uno de los principales problemas de la salud pública, y así lo reconoció la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1991. En el último reporte de la OMS del año 2017 se ha informado que hubo alrededor de 6,3 millones de nuevos casos y 1,3 millones de muertes debidas a la TB, siendo una de las 10 principales causas de muerte en el mundo, por encima de HIV y el paludismo. En la Tabla 1 se detallan los

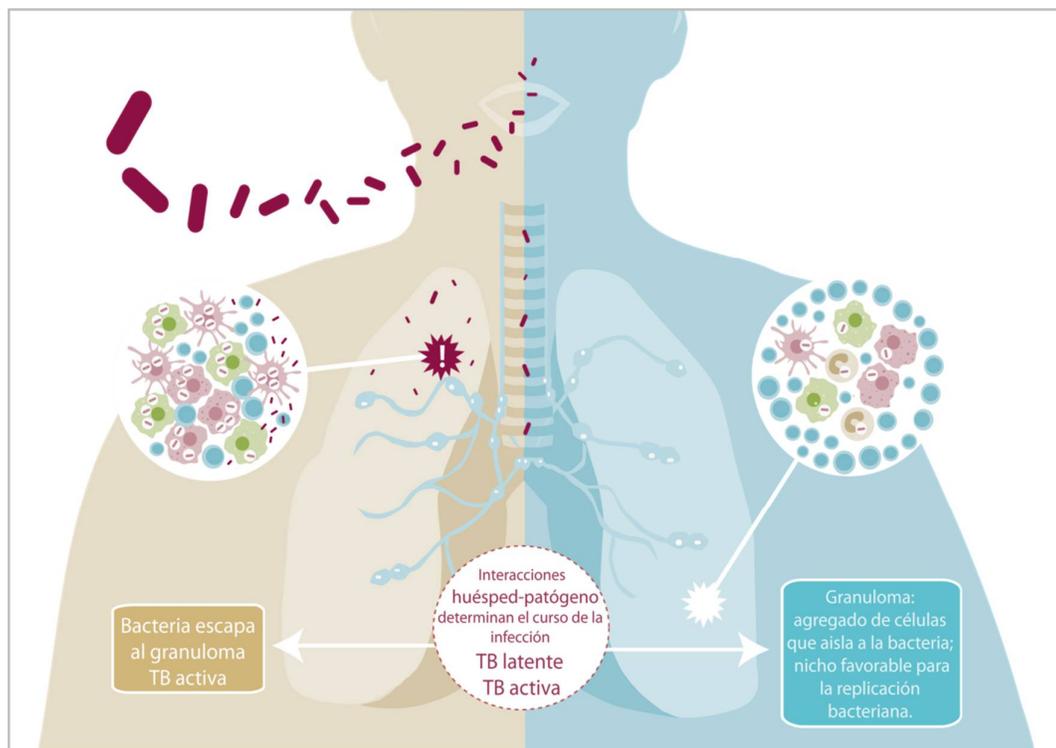
datos sobre la incidencia y mortalidad de la TB en el mundo y en nuestro país, correspondientes al año 2017 y 2016 respectivamente.

**Tabla 1:** Incidencia y mortalidad de la TB en el mundo y en nuestro país

	Personas infectadas	Casos nuevos	Casos nuevos / 100.000 habitantes	Muertes	Muertes / 100.000 habitantes
<b>GLOBAL<sup>a</sup></b>	14.000.000	6.300.000	86,3	1.300.000	17,8
<b>ARGENTINA<sup>b</sup></b>	10312	9760	23,7	721	1,6

<sup>a</sup> Base de datos de la OMS actualizada reporte del año 2017.

<sup>b</sup> Base de datos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Emilio Coni", actualizada hasta agosto de 2016. Ministerio de Salud, República Argentina.



**Figura 1 |** Ciclo de la infección del Mtb. Adaptado de Madhukar Pai y col. *Nature Reviews Disease Primers* 2 Tuberculosis, 2016 [6].

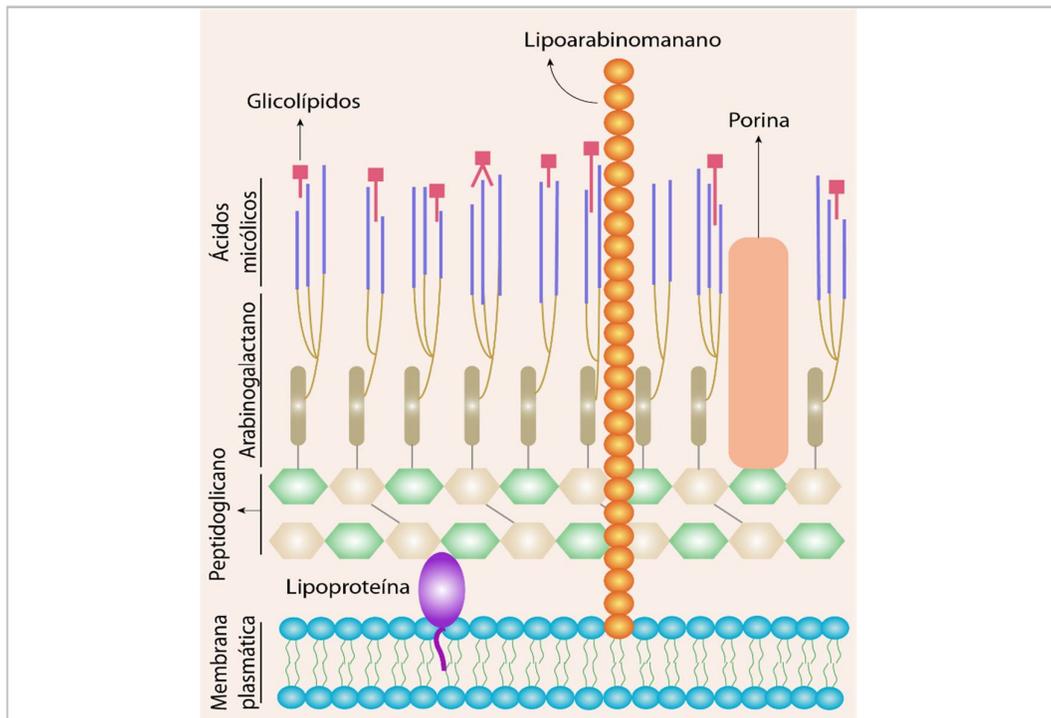
La pobreza, la falta de adherencia al tratamiento, el advenimiento de casos de TB resistente a drogas, la epidemia de HIV, pobres métodos diagnósticos, el deficiente acceso a los sistemas de salud, la limitada eficacia de la vacuna BCG y la falta de

disponibilidad de nuevas drogas, continúan siendo obstáculos para el control de la TB [7]. En este contexto, en 1993 la Organización Mundial de la Salud reconoció el resurgimiento de la TB declarando la emergencia sanitaria global (WHO, 2002). Además, en ese mismo año, la OMS estableció como meta para la erradicación de la tuberculosis el año 2020 a través del plan “*Stop TB*”; sin embargo, estas metas no han sido alcanzadas posponiendo dicho plan para el año 2050.

### **MICROBIOLOGÍA DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

La bacteria *Mycobacterium tuberculosis* pertenece al orden de los Actinomycetales (bacterias con forma de hongos), familia de las Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*, especie tuberculosis. Dentro de este género se ha definido un grupo denominado *M. tuberculosis complex* o complejo del bacilo tuberculoso, el cual agrupa especies tales como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* y *M. microti* [8]. Es un patógeno intracelular facultativo que puede infectar varias especies animales, aunque el humano es su principal hospedador. Mide 2-5 µm de largo y 0,2-0,3 µm de ancho, presenta forma de bastón, extremidades redondeadas, no posee esporas, ni ramificaciones o flagelos. Crece exitosamente en entornos ricos en oxígeno tal como el presente en los pulmones. Su período de duplicación es extremadamente lento (entre 15 y 20 h) comparado con otras bacterias. Las micobacterias son clasificadas como bacterias Gram-positivas, aunque presentan características de microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos. La característica diferencial de las micobacterias es que son ácido-alcohol resistente según la coloración de Ziehl-Neelsen y dicha particularidad se debe esencialmente a su pared celular, sumamente rica en lípidos. La envoltura de *Mtb* es una estructura compleja que tiene un rol decisivo en la patogénesis, dado que sus componentes median el contacto y reconocimiento de las bacterias por parte de las células del sistema inmune. Estructuralmente la envoltura de *Mtb* está constituida por dos estructuras principales, la pared celular propiamente dicha y la estructura externa [9].

La pared celular está compuesta por una capa interna compuesta por el peptidoglicano (PTG), una intermedia compuesta por el arabinogalactano (polímero de arabinosa y galactosa -arabinogalactano- AG) y una externa compuesta por ácidos micólicos (Figura 2). El PTG se encuentra covalentemente unido a AG, constituyendo el principal elemento estructural de la pared celular mientras que el ácido micólico se esterifica con el AG (mAG). Esta estructura constituye una poderosa barrera que otorga resistencia natural contra una variedad de agentes antimicrobianos y terapéuticos. La estructura externa del *Mtb* es particularmente rica en lipoarabinomanano-manosa (ManLAM), lipomananos (LM), fosfatidil-mio-inositol manósido (PIMs), arabinomanano, manano y glicoproteínas manosiladas. Tanto PIMs, LM como ManLAM están anclados a la membrana plasmática, éste último mediante fosfatidilinositol, y a su vez expuestos en la superficie del *Mtb* en donde actúan como ligandos para receptores de reconocimiento del hospedador y contribuyen a la patogénesis del *Mtb* [10].



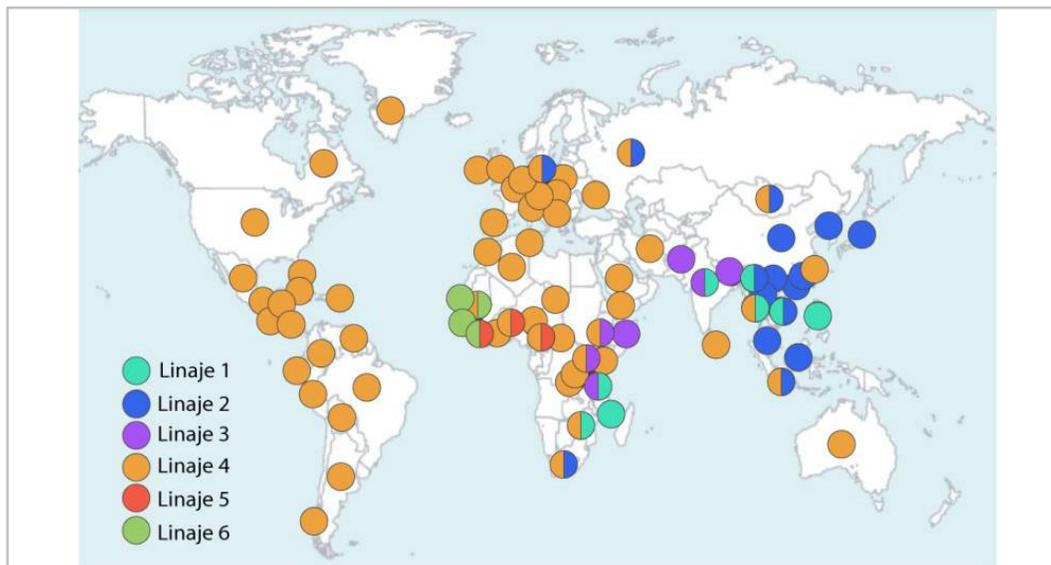
**Figura 2** | Modelo teórico de la envoltura de *Mtb*. Adaptado de Brown y col. *Nature Reviews Microbiology*, 2015 [11].

## VARIABILIDAD GENÉTICA DEL *MTB*

*Mtb* es uno de los patógenos humanos más exitosos y poco se conoce sobre su evolución. Es probable que a lo largo del último siglo la intervención humana, particularmente la vacunación masiva con BCG y el tratamiento con fármacos, haya ejercido una presión selectiva a la que sólo hayan sobrevivido los genotipos mejor adaptados. La influencia de la variación genética del *Mtb* en la infección tuberculosa es un área reciente de investigación que, al igual que en otras infecciones, demuestran que las mismas tendrían un papel esencial en el inicio de la tuberculosis. El *Mtb* moderno evoluciona a través de eventos de delección, duplicación y recombinación así como polimorfismo de nucleótidos únicos (SNP) que dieron origen a la emergencia de líneas separadas de cepas con características patogénicas diferentes. El estudio de la diversidad de SNP y de delecciones denominadas polimorfismos de secuencias largas en colecciones de cepas globales permitió definir 6 linajes filogenéticamente distintos con fuertes asociaciones con su origen geográfico: Indo-Oceánica (linaje 1), Asiática del Este (linaje 2), Africana-Este (linaje 3), Euro-americano (linaje 4), Africana-Oeste 1 y Africana-Oeste 2 (linajes 5 y 6 respectivamente) [12] (Figura 3).

En nuestro país el linaje prevalente es el Euro-Americano que comprende a diferentes familias: Haarlem, Latino-Americana-Mediterránea (LAM), familia X (Europea IS6110 de bajas bandas) y familia Tuscany (T) [13]. Los linajes de *Mtb* pueden poseer características patogénicas específicas surgidas a partir de las interacciones de larga data entre linajes particulares y poblaciones humanas [14]. De hecho, se han observado algunas cepas más exitosas que otras, tanto en términos del número de casos de TB asociados, como en términos de distribución geográfica. Técnicas más recientes como el estudio de la secuencia de inserción IS6110 y el *spoligotyping*, han permitido identificar de los aislados clínicos a cepas con amplia diseminación, cepas responsables de brotes de TB o aquellas que causaron casos únicos [12]. El entendimiento del impacto de la diversidad genética del *Mtb* sobre el

desarrollo de la TB y la respuesta inmune del hospedador, se inició a partir de trabajos describiendo cepas que produjeron brotes de TB a nivel mundial. Se postula que los genotipos prevalentes de *Mtb* han desarrollado mecanismos que les han permitido evadir la respuesta inmune y adaptarse a su hospedador. Dichos mecanismos involucran receptores que reconocen antígenos presentes en los aislados clínicos y no en la cepa de referencia H37Rv, desencadenando una respuesta inmune que diferiría de la de H37Rv. Desde su aislamiento en 1905, la cepa de *Mtb* H37Rv ha sido aplicada extensivamente en investigación biomédica siendo su genoma descifrado completamente en 1998 [15], sin embargo poco se conoce sobre la relevancia de dicho genoma en los aislados clínicos de *Mtb*.



**Figura 3** | Distribución global de los linajes de *Mtb*. Adaptado de Gagneux S. y Small P.M. *The Lancet infectious diseases*. 2007 [12].

Existe una clara evidencia de que las diferentes cepas de *Mtb* difieren en su virulencia, inmunogenicidad y susceptibilidad al stress oxidativo en modelos de infección. Sin embargo, el impacto de estas diferencias en la enfermedad humana aún no resulta claro [16].

## TRATAMIENTO

Según la OMS, los principales objetivos a cumplir del tratamiento contra la tuberculosis son:

- curar al paciente y restaurar su calidad de vida
- prevenir la muerte por TB activa o sus efectos a largo plazo
- prevenir la recaída
- reducir la transmisión de la TB a otras personas
- prevenir el desarrollo y la transmisión de la resistencia a los medicamentos

El curso del tratamiento de la TB depende de si el individuo se encuentra en su fase latente o activa y en la probabilidad de riesgo de la persona. El tratamiento *standard* consiste en la administración de un *cocktail* de fármacos; las principales drogas antituberculosas de primera línea utilizadas en la quimioterapia de la TB son: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB) o estreptomina [2]. El tratamiento comprende una fase inicial intensiva de 2 meses (INH, RIF, PZA y EMB en tomas diarias) seguida de una fase de consolidación más lenta que varía de 4 a 10 meses (INH y RIF) [1], según se trate de formas pulmonares leves, moderadas o severas. Dependiendo del estado y evolución del individuo, el régimen cambia y puede ser complejo de seguir.

La respuesta al por qué existe un régimen tan complejo que involucre múltiples fármacos para tratar la TB radica en la rápida tasa de mutación espontánea del *Mtb* [2]. Aunque siempre se realizan pruebas de susceptibilidad a los fármacos para monitorear la resistencia inicial del aislado clínico, el hecho de no completar el tratamiento o el incumplimiento del mismo y los regímenes terapéuticos inadecuados, pueden conferir nueva resistencia a los fármacos [2], [4].

En esta carrera para combatir una enfermedad que no conoce fronteras, es importante tener una clara comprensión de la TB en general. Esto sólo puede cumplirse con la intensa colaboración entre la investigación, los funcionarios de salud

pública, los profesionales de atención primaria y la población en general. Poniendo a prueba los límites de nuestros conocimientos actuales con el fin de mitigar la carga mundial de la TB.

## **LA TUBERCULOSIS RESISTENTE A DROGAS**

### **EMERGENCIA**

En las décadas de los 40' y 50', la aparición de antibióticos tales como la estreptomina, el ácido p-aminosalicílico, la isoniazida y la pirazinamida, tuvo un impacto crucial en la efectividad del tratamiento de la TB [17]. La efectividad de la quimioterapia y los intensos programas de lucha contra la TB lograron reducir notablemente las tasas de infección y muerte, dando como resultado que la TB comience a ser considerada como una enfermedad prevenible y curable. Sin embargo, hacia 1985 diversos factores tales como la prescripción de regímenes terapéuticos inadecuados, falta de disponibilidad y/o dudosa calidad de los fármacos, condiciones asociadas a mal absorción o diarrea, la infección por el VIH, los abandonos reiterados y la ingesta irregular del tratamiento farmacológico por parte del paciente, han hecho posible la aparición de casos de TB resistente a drogas [18], dificultando tanto la prevención como su tratamiento en los países industrializados y aumentando así la incidencia de la enfermedad.

La situación epidemiológica de la TB se agravó a partir de la década de los 90' debido a la irrupción de cepas multirresistentes a drogas (MDR) y extensivamente resistentes a drogas (XDR). La tuberculosis multirresistente a drogas (TB-MDR) es producida por cepas resistentes al menos a isoniazida y rifampicina, dos de las drogas de primera línea más efectivas. El término TB-XDR apareció por primera vez en el 2006 y define a la TB causada por cepas con resistencia a isoniazida y rifampicina, a una fluoroquinolona y al menos a una de las tres drogas inyectables: capreomicina, ampicilina o kanamicina [19]. Si bien los primeros casos de TB-MDR estuvieron

relacionados a brotes hospitalarios en pacientes infectados con VIH, actualmente se han expandido a individuos VIH negativos [19]. Tanto la TB-MDR como la TB-XDR surgieron en pacientes que abandonaron los tratamientos anti-TB (MDR adquirida). No obstante, estas cepas resistentes han sido capaces de diseminarse entre individuos sin antecedentes de TB (MDR primaria). En este contexto, la tuberculosis continúa siendo una enfermedad de emergencia mundial y más aun considerando que en el año 2017 se han estimado 601.000 casos nuevos de tuberculosis multirresistente a drogas a nivel global [20].

### **LA TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTE A DROGAS EN ARGENTINA**

En Argentina, la TB es la tercera causa de muerte por enfermedades infecciosas después de las septicemias y el SIDA. Su distribución es desigual, y la mayoría de los casos están concentrados en el noroeste argentino donde la incidencia triplica el promedio nacional. En base a la última encuesta nacional de resistencias en el país, llevada a cabo en 2015, se registraron un total de 128 casos de TB con algún tipo de resistencia, representando así el 1,19% del total de casos notificados y un 26% más que en 2014. De estos, 80 casos (62,5%) eran multirresistentes a drogas [21].

En nuestro país, la TB-MDR emergió a principios de los años 90' como una enfermedad asociada al VIH entre pacientes internados en hospitales de Buenos Aires (cepa Muñiz) y Rosario (cepas Rb y Ra) [22], [23]. Estas cepas se diseminaron a la comunidad afectando no sólo al personal de salud sino también a contactos domiciliarios o laborales [24], [25]. Las familias predominantes entre los pacientes con MDR-TB de nuestro país son Haarlem (36.3%), LAM (38.8%) y T (13.9%) [26].

La epidemiología molecular permite diferenciar las distintas cepas de *Mtb* a través de sus perfiles de marcadores genéticos. Los aislados clínicos de pacientes que comparten un genotipo particular o huella de ADN se pueden considerar epidemiológicamente ligados y representan casos de transmisión activa de TB (es decir que conforman un *cluster*), mientras que cepas con patrones de ADN únicos

reflejan la reactivación de infecciones latentes. La proporción de casos que forman parte de un *cluster* es una medida del *fitness* relativo ya que en el contexto epidemiológico, el menor *fitness* reproductivo de un patógeno se refleja en menos casos secundarios generados [27]. Así se identificaron mediante técnicas moleculares los genotipos de *Mtb* responsables de brotes intrahospitalarios en pacientes co-infectados con VIH. La cepa M (Muñiz) resultó responsable del brote ocurrido en el Hospital Muñiz de la ciudad de Buenos Aires (centro de referencia de enfermedades infecciosas para Argentina) [23], las cepas Ra y Rb del hospital Carrasco de la ciudad de Rosario [38] y la cepa C, del Hospital Cetrángolo del conurbano bonaerense [28]. Éste último fue auto limitado pero los dos primeros brotes no han sido controlados aún. Durante el período 2004-2009, el 64,6% de los pacientes TB-MDR diagnosticados (VIH positivos y negativos en conjunto) pertenecieron a algún *cluster*, y los dos mayores *clusters* nacionales corresponden a la cepa M del linaje Haarlem H2 genotipo SIT 2 (141 casos) y a la cepa Ra del linaje Latino-Americano-Mediterráneo genotipo LAM3 SIT 33 (49 casos) [26], [29]. En este trabajo de tesis nos centraremos particularmente en la cepa M. Esta cepa tiene un perfil de resistencia a drogas muy variable, probablemente debido a eventos de varias cadenas de transmisión simultáneas. Más aun, los aislados provenientes de los dos primeros pacientes diagnosticados con TB-XDR correspondieron al genotipo M, la cual también fue responsable del único caso de TB totalmente resistente a drogas detectado hasta ahora en el país, lo que ejemplifica su aparente habilidad de acumular nuevas resistencias a drogas sin afectar su capacidad de diseminación en la comunidad. La cepa M se transformó en el genotipo de *Mtb* MDR más prevalente en todo el país y en el responsable de causar transmisión secundaria relacionada con VIH en hospitales de distritos cercanos [30]. Posteriormente se descubrió que la cepa M fue la responsable de la aparición de casos de *Mtb* MDR en paciente VIH negativos sin tratamiento previo para TB [24], muchos de los cuales eran trabajadores de la salud. En una encuesta realizada a nivel nacional entre los años 2003-2009, la cepa M mostró una tendencia a

decaer pero aun así representando un 29 y 40% de los casos de TB-MDR y XDR respectivamente, y como tal sigue siendo el mayor brote en curso de tuberculosis MDR en Argentina [26]. Sin dudas, este brote representa el registro más temprano de transmisión de una cepa de *Mtb* con un genotipo pre-XDR.

## **INMUNOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS**

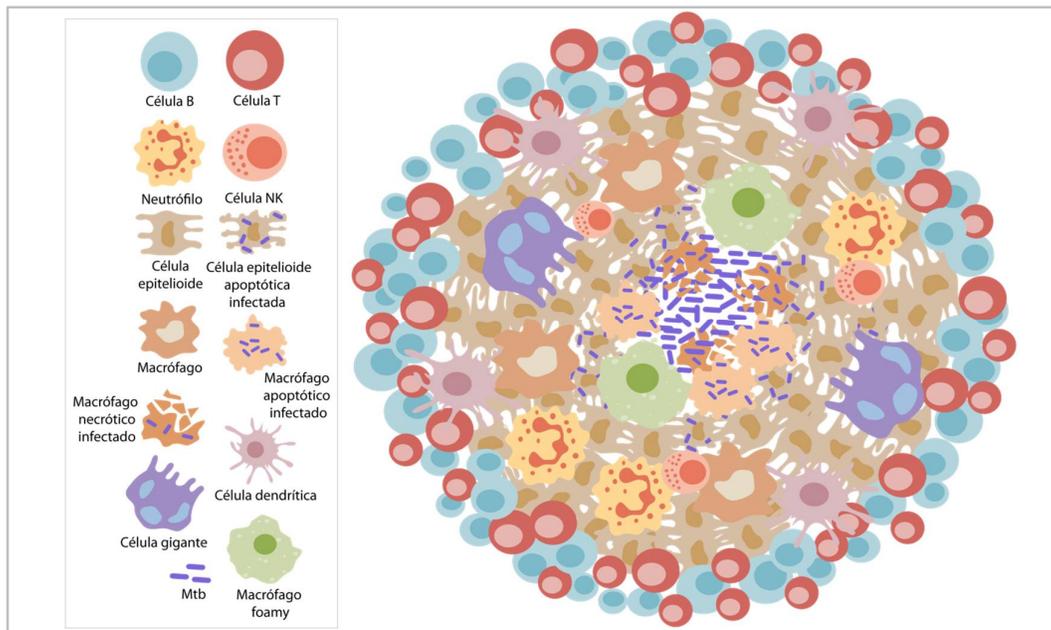
### **LA RESPUESTA INMUNE CONTRA *MTB***

La respuesta inmune contra *Mtb* es multifacética y compleja. De Martino y col. [31] utilizan la siguiente premisa para describir el inicio de la respuesta frente a la tuberculosis una vez que la bacteria invade al huésped: “Todo se decide el primer día que se convierte en el día más largo”, y los mecanismos de la inmunidad innata son esenciales para limitar el crecimiento de la bacteria y su expansión en la fase inicial de la infección.

Un individuo sano se infecta con *Mtb* a partir de la inhalación de microgotas que lo contienen expulsadas por un individuo enfermo que facilita la diseminación del bacilo a la comunidad sana. Una vez inhalado, el *Mtb* inicia un intenso contacto con las células que recubren el epitelio pulmonar, siendo aún materia de debate su participación en la eliminación inicial de la bacteria o su rol como nichos del *Mtb*. Superadas las barreras del tracto respiratorio bronquial, el bacilo llega al compartimiento alveolar donde es fagocitado principalmente por macrófagos alveolares y probablemente por otras células intersticiales al llegar al pulmón [1]. Si bien el macrófago ingiere y puede matar a los bacilos fagocitados a través de la activación de mecanismos bactericidas [32], la persistencia de la infección se atribuye a la capacidad del *Mtb* para quebrantar las respuestas inmunes del huésped en favor de la supervivencia y el crecimiento de las micobacterias dentro de las células infectadas [33]. En el caso particular de los macrófagos, el *Mtb* ha desarrollado eficazmente mecanismos de evasión tales como el bloqueo de la producción de

intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno y la inhibición de la formación del fagolisosoma, entre otros, evitando así su destrucción intracelular [34]. Así, La contención de la infección inicial dependerá de la capacidad intrínseca del macrófago (*background* genético del hospedador) y de la cepa de *Mtb* inhalada (factores de virulencia innatos de cada cepa). Los bacilos que escapan a los mecanismos bactericidas se multiplican en forma logarítmica dentro de las células fagocíticas infectadas tales como macrófagos (Mac) y células dendríticas (CD) y posiblemente no fagocíticas como las del epitelio pulmonar e inducen la producción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias que sirven como señales de la infección [35] atrayendo en forma temprana a monocitos desde sangre periférica junto con otros componentes innatos de la respuesta inmune tales como PMN, células “Natural Killer”, y las células  $T\gamma\delta+$  que en conjunto inician el proceso inflamatorio temprano y formación incipiente del granuloma, característica primaria de la enfermedad [36], [37] (Figura 4). La respuesta innata es mediada por patrones reconocimiento de receptores expresados en Mac y CD que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) expresados en *Mtb* [38]. A su vez las CD infectadas incapaces de destruir al bacilo migran a los nódulos linfáticos regionales en donde activan a linfocitos T naïve que se diferencian a linfocitos T efectores iniciándose la respuesta adaptativa del hospedador. Los linfocitos T efectores que circulan en sangre periférica son atraídos al foco infeccioso en donde contribuyen a la organización del granuloma con un núcleo necrótico de Mac infectados y células epitelioides que proveen de soporte nutricional al *Mtb*, y una pared de macrófagos activados y linfocitos T CD4+ y CD8+ efectores que restringen la diseminación del bacilo. De esta forma, se contiene la infección, controla el crecimiento de *Mtb* y termina el período de replicación rápida del *Mtb* [39] lo que se traduce en una infección primaria controlada por el hospedador inmunocompetente o infección latente. Como resultado de la persistencia bacteriana y la falla del sistema de vigilancia inmune del hospedador, en algún punto, y luego de muchos años de latencia, factores exógenos [40] pueden desencadenar la reversión del estado de

latencia hacia un estado de activación y reanudar la división celular [41]. Cuando la infección progresa, el centro necrótico caseoso del granuloma se licua y cavita, vertiendo miles de bacilos infecciosos en las vías aéreas. Este daño pulmonar gatilla una expectoración productiva, que facilita la generación de aerosoles infecciosos y el cierre del ciclo de vida bacteriano [39]. De esta forma, los granulomas resultan esenciales para el control de la infección micobacteriana, pero paradójicamente, también son responsables de la inmunopatología típica de estas infecciones [42].



**Figura 4** | Estructura y constituyentes celulares del granuloma tuberculoso. Adaptado de L. Ramakrishnan, *Nature Reviews Immunology*, 2012 [36].

Una característica de la respuesta protectora frente *Mtb* es la existencia de un retraso en el inicio de la respuesta inmune adaptativa en comparación con las respuestas observadas frente a otros patógenos [43]. En general, se observa que la bacteria es capaz de acceder a los ganglios drenantes del pulmón y de promover su diseminación antes de que comience la respuesta inmune adaptativa. Este retraso permite que la bacteria se establezca y que la respuesta adquirida comience bajo condiciones inflamatorias ya iniciadas y moduladas por la bacteria. Por lo tanto se propone que *Mtb* podría ejercer una actividad regulatoria inhibiendo la actividad

migratoria y/o la presentación antigénica de las células presentadoras de antígenos [44].

Distintas poblaciones de células T desempeñan un papel relevante en el desarrollo de la respuesta inmune protectora tales como: las células T CD4 que reconocen antígenos peptídicos en el contexto moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II; las células T CD8 que reconocen antígenos peptídicos en el contexto moléculas del CMH de clase I; las células T  $\gamma\delta$  que reconocen ligandos antigénicos poco frecuentes –sobre todo fosfoligandos– de modo independiente de las moléculas del CMH; y las células T CD1-restringidas que reconocen glicolípidos, los cuales son muy abundantes en la pared micobacteriana y son presentados por moléculas CD1 [45].

En particular en este trabajo de tesis nos focalizamos en la respuesta inmune innata que involucra a las células del epitelio bronquial humano así como a los neutrófilos como células fagocíticas por excelencia que juegan un rol preponderante en la respuesta frente a la infección por *Mtb*.

## **EL EPITELIO PULMONAR HUMANO**

### **ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL EPITELIO PULMONAR HUMANO**

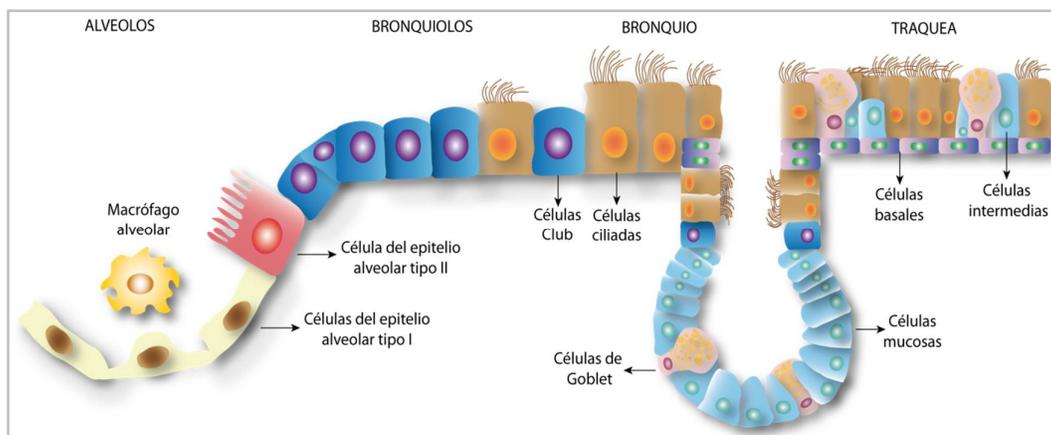
El pulmón es un órgano revestido por distintos tipos de células epiteliales ubicadas en diferentes regiones anatómicas. El epitelio consiste en una capa de células ciliadas secretoras unidas a una membrana basal mediante uniones estrechas en la superficie apical proveyendo una barrera celular impermeable. La integridad del epitelio y su unión a la membrana basal se da a través de numerosos mecanismos de adhesión que incluyen conexiones célula-célula por desmosomas y célula-matriz hemidesmosomal [46]. Al menos ocho tipos morfológicamente diferentes de células epiteliales están presentes a lo largo del epitelio respiratorio humano: basales, Kultschitzsky, intermedias, células en cepillo, serosas, Goblet, ciliadas y club [47].

Sobre la base de criterios ultraestructurales, funcionales y bioquímicos, se pueden clasificar en tres categorías: basales, ciliadas y secretorias [48] (Figura 5).

**Las células basales** están extendidas a lo largo de todo el epitelio. Estas células se unen firmemente a la membrana basal [49] y juegan un papel fundamental en la unión de más células superficiales a dicha membrana. Se cree que la célula basal es la célula madre primaria que da lugar a las células epiteliales secretorias y ciliadas. Además de su rol como progenitora y demás funciones estructurales, también secretan moléculas bioactivas como endopeptidasa neutral, productos de 15-lipoxigenasa y citoquinas [50].

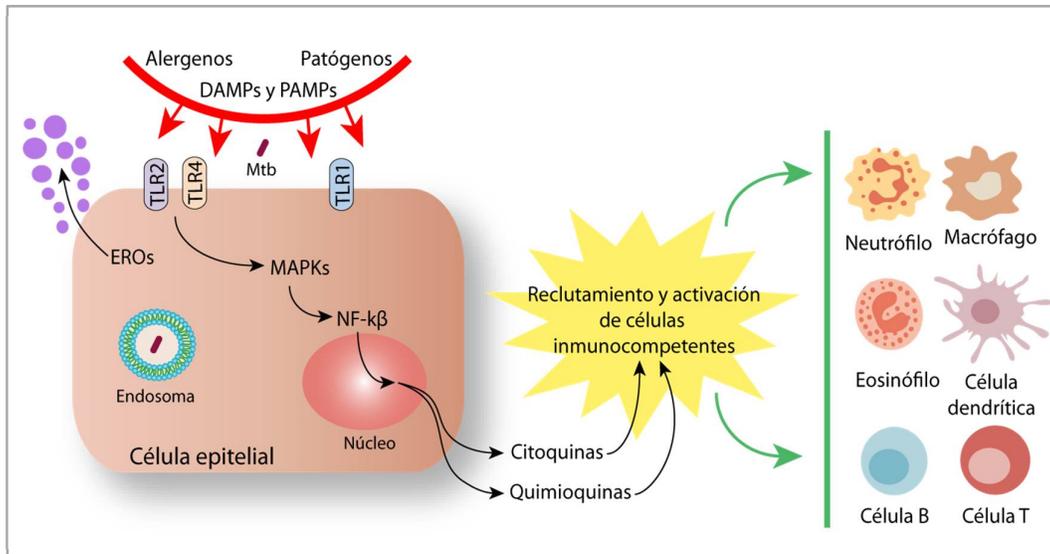
**Las células ciliadas** epiteliales son las predominantes en las vías respiratorias, representan un 50% del total de todas las células epiteliales [48]. Poseen más de 300 cilias/célula y numerosas mitocondrias. Su función principal es el transporte de mucus desde los pulmones hacia el lumen de la garganta.

**Las células de Goblet** se caracterizan por tener gránulos de mucina unidos a la membrana, molécula que al ser secretada actúa como lubricante y protector del revestimiento del sistema respiratorio [51]. La producción de la cantidad correcta de mucus y la viscoelasticidad del mismo son fundamentales para una depuración eficiente. Se cree que estas células son capaces de autorenovarse y diferenciarse en células epiteliales ciliadas [50].



**Figura 5** | La barrera epitelial de las vías respiratorias. Adaptado de Whitsett y col, *Nature Immunology*, 2014 [52].

En un principio se pensaba que el epitelio pulmonar era una barrera física pasiva para el intercambio de gases [53] cuya función principal era impedir el paso de sustancias inhaladas potencialmente peligrosas y, por lo tanto, prevenir la invasión de tejidos. Sin embargo, las células epiteliales pueden desempeñar funciones críticas en el inicio y la expansión de la respuesta inmune del huésped en el pulmón y proveer así la defensa inicial contra microorganismos [54]. Dado que el epitelio es el primer sitio de contacto tanto para estímulos físicos como inflamatorios el mismo cumple un rol importante en lo que refiere a la atracción y activación de células inflamatorias en respuesta a injurias [50]. Con una amplia variedad de patrones de reconocimiento de patógenos, en especial receptores de tipo *Toll* (TLRs), las células del epitelio respiratorio reconocer al patógeno y actuar como centinela induciendo una respuesta inmune innata y como consecuencia activar la respuesta adaptativa [55]. Estos TLRs median la interacción huésped-patógeno a través de PAMPs e inician una adecuada señalización antes de que las células inmunocompetentes sean reclutadas hacia las vías aéreas [56]. La activación de las células epiteliales puede resultar en la inmediata respuesta del hospedador para excluir al patógeno, mediante la producción de péptidos antimicrobianos incluyendo lisozima, lactoferrina, defensinas, colectinas, SPLI, hepcidina y catelicidina (LL-37), siendo elementos esenciales de la inmunidad innata [57], [58] junto con citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas que pueden activar otras células innatas de la mucosa [54]. Estos factores pro-inflamatorios tienen la función de reclutar y activar células fagocíticas principalmente CD, Mac y PMN y otras células inmunocompetentes, para erradicar microorganismos y/o células infectadas [59] (Figura 6).



**Figura 6** | Funciones desempeñadas por las células epiteliales en el inicio y la expansión de la respuesta inmune del huésped en el pulmón. Adaptado de Whitsett y col. *Nature Immunology*, 2015 [52].

## EPITELIO BRONQUIAL

El árbol bronquial humano está cubierto por una capa continua de células epiteliales que juegan un papel crítico en el mantenimiento del conducto aéreo, y son centrales en lo que refiere a las defensas en el pulmón contra contaminantes inhalados [60].

La función principal del epitelio bronquial es actuar como barrera de defensa contribuyendo al mantenimiento normal de la función de las vías aéreas. Las células del epitelio bronquial constituyen la interfase entre el medio ambiente externo y el medio interno, lo cual lo convierte en un importante blanco para organismos inhalados.

Hay evidencias crecientes de que las células del epitelio bronquial tienen un papel importante en la inducción, amplificación y regulación de la respuesta inflamatoria. Las células del epitelio bronquial expresan TLRs 1-10 y reconocen ligandos de TLRs 1-6 y TLR-9 que permiten una rápida respuesta a una amplia variedad de patógenos [61]. Además se ha demostrado que la infección de células de la línea de epitelio bronquial humano BEAS-2B por *Streptococcus pneumoniae*

aumenta la expresión de las proteínas NOD-1 y NOD-2 (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) que reconocen péptidos derivados de peptidoglicano y muramildipéptido respectivamente [62]. Asimismo, recientemente se ha demostrado que la infección con *Aspergillus fumigatus* induce la expresión de Dectin-1 [63], ampliando el rango de patógenos detectables. El reconocimiento del patógeno conduce a la activación del epitelio bronquial que libera al lumen aéreo numerosas sustancias para neutralizar o matar a los microorganismos invasores tales como lisozima, lactoferrina, defensinas, colectinas, pentraxinas, el inhibidor de la proteasa secretoria leucocitaria, hepcidina y catelicidina así como especies reactivas de oxígeno como resultado de un desbalance oxidativo/anti-oxidativo que contribuye al desarrollo de una inflamación pulmonar y daño tisular [64]. La deficiencia o inapropiada regulación de estos factores puede contribuir a la colonización de las células del epitelio bronquial humano por microorganismos. Además las células epiteliales bronquiales producen citoquinas pro o anti-inflamatorias, factores de crecimiento como GM-CSF y quimioquinas que reclutan y activan a células inmunocompetentes de la inmunidad innata y adaptativa. Factores de virulencia tales como flagelina [65] y bacterias enteras como *S. pneumoniae* [66], *P. aeruginosa* y *S. aureus* [65], [67] inducen la liberación de IL-8 que desempeña un papel importante en la inflamación pulmonar [68], [69]. Agonistas de TLR-2, TLR-4 y TLR-9 estimulan la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 en el epitelio pulmonar, dando como resultado la posterior estimulación de factores que regulan de manera auto o paracrina el proceso inflamatorio [70]–[72].

Considerando el rol crítico de las células del epitelio bronquial humano en el mantenimiento de la estructura normal y funcional de las vías aéreas, es de esperar que una desregulación en el epitelio bronquial pudiera contribuir a la patogénesis de muchas enfermedades pulmonares [73] entre ellas la tuberculosis.

## ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR *MTB* EN EL TRACTO RESPIRATORIO

El *Mtb* debe superar varios “puntos de interacción” (PI) que sirven como barreras para evitar la infección en el pulmón [74], y representan estrategias efectivas de defensa cuyo propósito es la remoción física de microbios inhalados, secreción de enzimas y mediadores pro y anti-inflamatorios para combatir la infección [75], y reconocimiento bacteriano a través de patrones moleculares asociados a patógenos por receptores de reconocimiento expresados en células del epitelio pulmonar y células mieloides. Estas estrategias permiten una eliminación efectiva de alrededor del 99% de los microbios inhalados en la nariz y las vías respiratorias superiores. Debido a que el *Mtb* ha desarrollado múltiples estrategias para manipular la respuesta inmune del huésped, es capaz de superar estas barreras y acceder hacia las profundidades del pulmón [76].

El *Mtb* puede causar manifestaciones de la enfermedad en todos los compartimentos del tracto respiratorio (ej. cavidad nasal, faringe, laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos, alveolos). Por lo tanto, para que pueda infectar una célula en el espacio alveolar, debe hacerse camino a través de la anatomía pulmonar y desafiar las leyes de la física que la gobiernan [77] así como factores inmunológicos. Por ejemplo, una microgota que contiene *Mtb* debe evadir el reflejo de la tos, la geometría de las vías aéreas, humedad, barrido mucociliar y compuestos bactericidas de las mucosas, etc. [78]. Sin embargo, las microgotas que logran atravesar estas barreras se encuentran con el **primer PI: la tráquea y el tallo bronquial principal** que se bifurca para ingresar a cada pulmón. Las células bronquiales epiteliales son células ciliadas, cubiertas de mucus. Este mucus circula activamente y contribuye a atrapar las microgotas que contienen *Mtb* permitiendo su continua remoción de las vías aéreas limitando así el acceso del *Mtb* hacia el alvéolo. Sin embargo, la inflamación en las vías aéreas puede perturbar la protección pulmonar y regeneración induciendo

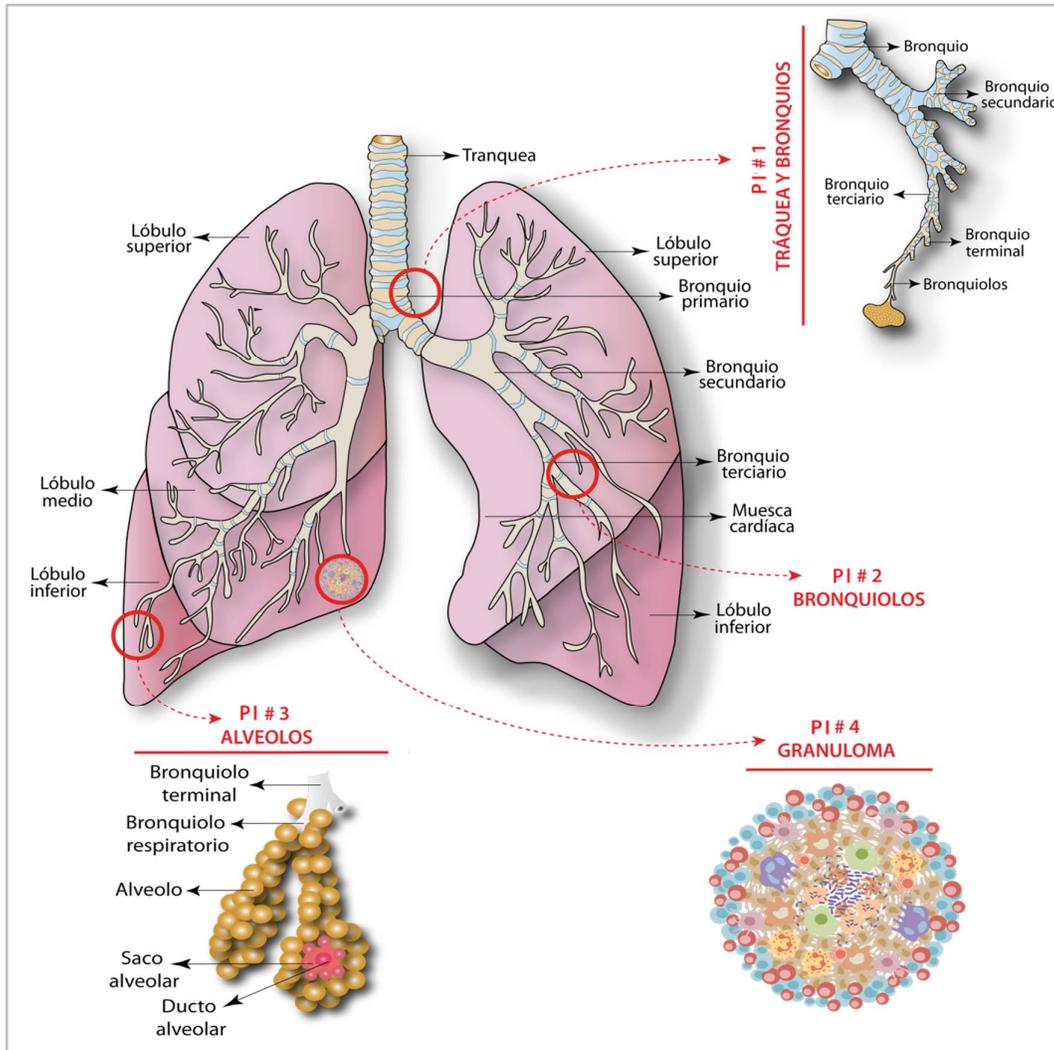
inflamación de las membranas mucosas que revisten los bronquios y aumentando la producción de mucus bronquial, limitando de este modo la eliminación microbiana. Así, la inflamación en las vías aéreas puede resultar en un prolongamiento de la infección por *Mtb* y una deposición/movimiento del *Mtb* hacia áreas sanas del pulmón [77].

El epitelio bronquial ha sido descrito como reservorio del *Mtb*, donde la inducción de beta defensinas podría limitar la supervivencia bacteriana y, por otro lado, residir en una vacuola endosomal tardía no acidificada dentro del epitelio bronquial podría facilitar la persistencia del *Mtb* [79]; de hecho, ADN de *Mtb* ha sido aislado de células del epitelio bronquial de pacientes infectados de manera latente con *Mtb* y en ratones, sugiriendo que la micobacteria puede persistir intracelularmente en estas células no fagocíticas del tejido pulmonar aún en ausencia de evidencia histológica de respuesta inmune [80]. Luego del tránsito a través de los bronquios, las microgotas de *Mtb* se encuentran con el **segundo PI: la división de los bronquios en bronquiolos, bronquiolos terminales y respiratorios**. Estos últimos se dividen en ductos alveolares que se compartimentalizan en compartimentos globulares diminutos llamados **alvéolos** y representan el **tercer PI** para *Mtb*. El *Mtb* interacciona con las células del epitelio alveolar (EA) y macrófagos alveolares (MA) en el espacio alveolar. Los MA son las primeras células fagocíticas profesionales en contactar al *Mtb* [81] y constituyen la primera línea de defensa contra las bacterias inhaladas [82]. Poseen propiedades fagocíticas y de eliminación del patógeno altamente eficientes que deberían ser suficientes para controlar la infección, sin embargo, los patógenos intracelulares adaptados como el *Mtb* pueden tomar ventaja y ser capaces de residir y multiplicarse dentro de los mismos [83]. La invasión del *Mtb* a las células del EA puede también jugar un rol importante en el establecimiento de la infección [84]. Durante la infección primaria, el contacto del *Mtb* con las células del EA se da en baja frecuencia. Aunque, dichas células se pueden convertir en actores claves cuando grandes cantidades de bacterias son liberadas desde las células fagocíticas infectadas que han muerto o de granulomas perturbados [85], [86]. Así, las células del EA podrían

representar un nicho intracelular transitorio para *Mtb* en el que la bacteria se adapta y sobrevive. En apoyo a este concepto, el *Mtb* tiene la capacidad de infectar y replicar dentro de células del epitelio pulmonar [86] que, junto con los macrófagos y las células dendríticas, podrían servir también como un portal de entrada hacia el intersticio donde se encuentran con células fagocíticas intersticiales. En tanto la inflamación progresa, el establecimiento del *Mtb* en los alvéolos conlleva al flujo de monocitos y al reclutamiento de neutrófilos [87] jugando estos últimos un rol importante en el control de la infección por *Mtb* [88] a través de procesos oxidativos y no oxidativos [89], [90].

El último PI se da entre el *Mtb* y el **granuloma** en el pulmón. Los granulomas permiten la persistencia de la bacteria durante la infección latente y provee un nicho donde la bacteria es más refractaria. Cuando la infección por *Mtb* progresa hacia una enfermedad activa, los granulomas aumentan su tamaño y ya no pueden contener al *Mtb* dando lugar a manifestaciones de la enfermedad tuberculosa facilitando una eficiente expectoración de microgotas que contienen el *Mtb* y así iniciar el ciclo de transmisión [91].

En la figura 7 se muestran de manera esquemática los puntos de interacción (PI) a lo largo del compartimento pulmonar que determinarán o no el éxito de la infección por *Mtb*.



**Figura 7** | Puntos de interacción a lo largo del pulmón que determinan el suceso o no de la infección por *Mtb*. Adaptado de Torrelles y col. *Trends in Microbiology*, 2017 [78].

## LOS NEUTRÓFILOS Y SU ROL EN LA RESPUESTA INMUNE FRENTE AL *MTB*

Los neutrófilos (PMN) son granulocitos que ejercen un rol crítico en la respuesta inmune frente a patógenos [92], [93]. El desarrollo de los PMN comienza en la médula ósea donde se generan aproximadamente  $1-2 \times 10^{11}$  células por día y la liberación de los mismos aumenta durante períodos de infección en respuesta a la mayor demanda del sistema inmune. Una vez en el foco inflamatorio, el PMN activado elimina a los patógenos a través de diferentes estrategias que incluyen fagocitosis,

estallido respiratorio, degranulación [94] y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).

**Fagocitosis:** luego de la unión de microorganismos opsonizados con anticuerpos o componentes del complemento a sus receptores específicos, se activa una cascada de señalización intracelular y reordenamientos del citoesqueleto que inducen la invaginación de la membrana del PMN lo que permite encerrar al microorganismo en un fagosoma. Luego, el fagosoma se fusiona con los gránulos y lisosomas del PMN formando fagolisosomas que contienen péptidos y proteínas con actividad microbicida los cuales inician mecanismos degradativos que inducen la muerte o eliminación del microorganismo y/o las partículas fagocitadas [95].

**Producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno:** otro de los mecanismos microbicidas es la generación de EROs en un proceso denominado estallido respiratorio, el cual es mediado por el complejo enzimático nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa. Este complejo comprende componentes citosólicos y componentes asociados a membrana. Cuando el PMN está en reposo, la separación física de los componentes de la enzima garantiza la inactividad de la misma. La activación del mismo promueve el ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa generando EROs [96]. Estas especies, altamente reactivas, son liberadas en los fagosomas donde oxidan componentes críticos de lípidos y proteínas microbianas. Asimismo, las EROs son liberadas al citosol donde alteran el estado de reducción de la célula y oxidan el contenido celular incluyendo proteínas y lípidos modificando su función. Por otro lado, los PMN activados pueden producir óxido nítrico (NO), aunque menos eficientemente que EROs, y peroxinitrato, un producto altamente reactivo producto de la oxidación del NO [97].

**Degranulación:** Los PMN almacenan en sus gránulos distintas proteínas y enzimas hidrolíticas tales como: péptidos catiónicos, proteasas, lactoferrina y mieloperoxidasa (MPO). Una vez activado el PMN, los gránulos se fusionan con el

fagosoma contribuyendo a la actividad microbicida de estos compartimentos, o con la membrana plasmática, liberando su contenido al espacio extracelular, acción que crea un ambiente antimicrobiano inhóspito para el patógeno [98].

**Formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs):** recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo por el cual los PMN atrapan y eliminan patógenos. Una vez que se encuentra con el patógeno, el PMN puede morir a través de un mecanismo de muerte celular (NETosis) por medio del cual pierde la integridad de la membrana nuclear y granular y, una vez rota la membrana citoplasmática, libera al espacio extracelular una red de cromatina condensada denominada trampa extracelular de ADN o NET [93], [99]. Esta estructura contiene histonas, gránulos anti microbianos y proteínas citoplasmáticas que le permiten inmovilizar y matar al microorganismo invasor.

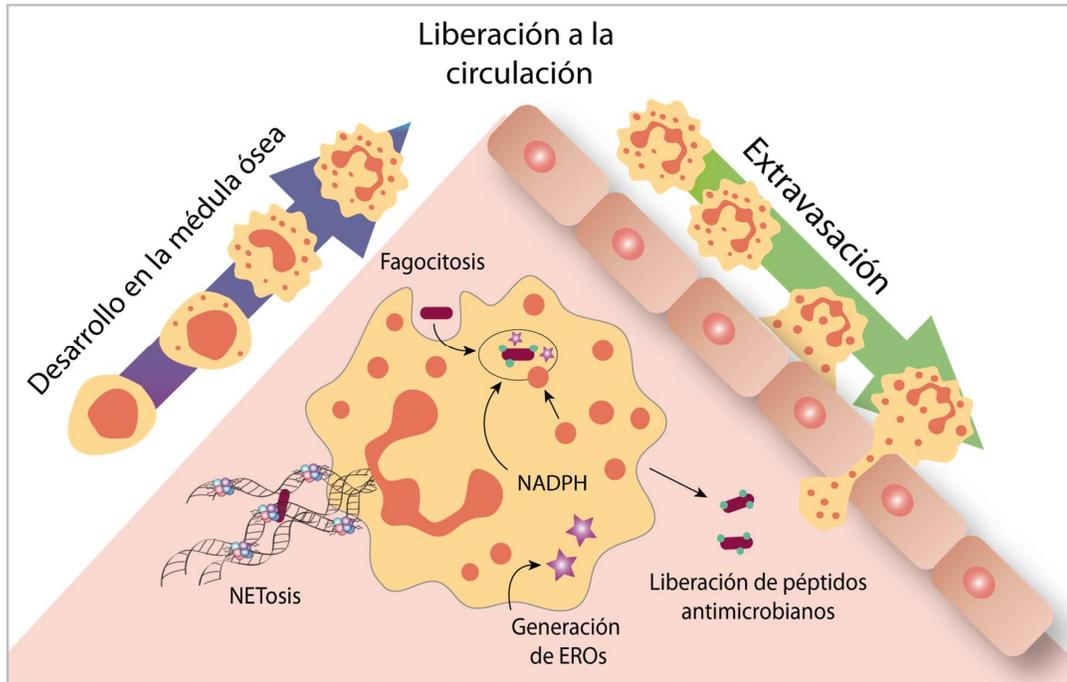
El estudio de las funciones de los PMN en la inmunidad ha sido profundizado en el último tiempo gracias al renovado interés en estas células que han sido por mucho tiempo relegadas. Estas participan activamente en la activación y regulación de ambas respuestas inmunes innata y adaptativa [100], [101]. Dichas funciones han llevado a reconsiderar el rol de estas células en las enfermedades infecciosas y no infecciosas, particularmente la tuberculosis [87].

Hasta ahora, la información sobre el rol de los PMN en el contexto de la infección con *Mtb* es bastante contradictoria y debatida, ciertos estudios los relacionan con el control y otros los asocian con la patología de la tuberculosis [97] ya que por un lado, participan en la generación del granuloma, en la inmunidad adquirida y son capaces de eliminar al *Mtb* (aunque este último punto es también actualmente tema de debate); y al mismo tiempo, estas células pueden permitir el crecimiento intracelular de *Mtb*, también están involucradas en la transición hacia la enfermedad activa, median la destrucción tisular y están relacionadas con la severidad y progresión de la enfermedad.

Los PMN son las primeras células en llegar al sitio de infección [102]–[104] y la tuberculosis no es la excepción, siendo las células más abundantes en el lavado broncoalveolar y en el esputo en pacientes con TB activa, incluso la neutrofilia está asociada con un retraso en la eliminación de la bacteria del esputo al momento del diagnóstico de la enfermedad [105], y se encuentran en segundo lugar, luego de los linfocitos, en los pulmones [106].

Una vez que llegan al sitio de infección, los PMN reconocen la bacteria directamente o a través de Fcy o receptores del complemento y la fagocitan. La fagocitosis y la subsecuente eliminación del patógeno requiere la activación del PMN que se lleva a cabo en un proceso que incluye una pre activación inicial. La siguiente etapa dependerá de la exposición de los PMN a determinadas citoquinas (ej. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), PAMPs, quimioquinas (ej. IL-8) y factores de crecimiento (ej. GM-CSF) o a su interacción con otras células circundantes [107]. Si los PMN pueden matar la micobacteria *in vivo* dependerá probablemente del microambiente tisular, estadio de la infección, genotipo del huésped y organismo infectante [87]. La eliminación de la bacteria fagocitada es mediada por mecanismos que incluyen degranulación, producción de EROs y formación de NETs, eventos gatillados por productos bacterianos o mediadores solubles (Figura 8). Posterior a la degranulación, proteínas bactericidas asociadas a los gránulos y otros péptidos son descargados hacia la vacuola fagocítica que contiene la bacteria [108]. Estas células son además una fuente importante de citoquinas específicas que promueven al reclutamiento y activación de otras células inmunocompetentes, contribuyendo entonces a la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa contra el *Mtb* [109], por ejemplo, la producción de TNF- $\alpha$  por los PMN activados estimula la diferenciación de células dendríticas y macrófagos [110], [111], aumenta la fagocitosis del *Mtb* por células fagocíticas [112], [113], la activación de células T y la formación del granuloma [112]. En respuesta al *Mtb*, los PMN también secretan IL-8, quimioquina crítica implicada en el reclutamiento leucocitario a las áreas de formación del granuloma así como al estallido respiratorio

de los PMN [114], [115], siendo todos estos mecanismos importantes en la respuesta a la infección por *Mtb*. Sin embargo, estos mismos factores necesarios para asegurar protección inmune al huésped pueden ser perjudiciales y desencadenar daño tisular.



**Figura 8 | Mecanismos efectores de los neutrófilos. Adaptado de Kruger y col. PLoS Pathogen, 2015 [116].**

Durante las primeras horas luego de la infección, los PMN pueden efectivamente eliminar a los microorganismos, aunque existe también la posibilidad de diseminación del bacilo viable. Si la infección no se resuelve, la interacción subsiguiente de los PMN con otros fagocitos así como su influencia sobre la respuesta T, lo cual podría determinar el curso clínico e inmunológico de la infección. Esto puede ir desde una respuesta temprana efectiva hacia una replicación descontrolada, excesiva inflamación y una enfermedad primaria progresiva. En la infección establecida y/o la enfermedad avanzada, los PMN pueden contribuir a la patología, pero podrían también representar un mecanismo compensatorio del huésped frente a la replicación bacteriana descontrolada [87].

## INTERACCIÓN ENTRE EL EPITELIO PULMONAR Y LOS NEUTRÓFILOS

Como se mencionó anteriormente, el epitelio pulmonar es capaz de liberar quimioquinas al entorno para facilitar la atracción de células inmunocompetentes al sitio de infección y una compleja red de citoquinas que regularán la activación de dichas células. Se ha demostrado en los procesos neumónicos que los PMN que han migrado de circulación cambian su fenotipo de PMN en descanso a células pre-activadas [117]. Dicha activación dependerá de los factores solubles secretados incluyendo IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, entre otros y adicionalmente por productos bacterianos. Los PMN pre-activados tienen la habilidad de aumentar notablemente la secreción de EROs frente a un segundo estímulo tal como el componente de pared bacteriana N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) [118]. Por otro lado, se ha demostrado que el factor de crecimiento epidérmico, involucrado en la reparación tisular, induce un aumento de la secreción de IL-6, IL-8, GM-CSF y TNF- $\alpha$  por el epitelio bronquial impactando finalmente sobre la migración y apoptosis de los PMN [119]. Cabe preguntarse entonces si el microambiente derivado del epitelio bronquial infectado por las distintas cepas de *Mtb* puede pre-activar a los PMN recientemente migrados y modular su supervivencia y respuesta funcional frente al encuentro con la micobacteria liberada al espacio extracelular.

# OBJETIVOS

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

El *Mtb*, causante de la tuberculosis humana y animal, infecta primariamente el pulmón y es reconocido por su capacidad para evadir la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador. Localizado en la interfase entre el medio ambiente y el hospedero, el epitelio respiratorio no solo forma parte de la barrera mecánica responsable del intercambio gaseoso, sino que también actúa como centinela de patógenos. La adhesión de los patógenos a las células epiteliales del tracto respiratorio permite la colonización de las mismas. La identificación de los microorganismos por receptores especializados presentes en las células epiteliales bronquiales induce la liberación de factores inflamatorios y quimiotácticos que influirían en la posterior respuesta inmune desarrollada por el hospedador.

Durante la infección con *Mtb*, los PMN son las primeras células en llegar al foco infeccioso y tienen un rol crítico en la respuesta inmune frente a patógenos. Una vez en el foco inflamatorio, el PMN activado elimina a la bacteria a través de diferentes estrategias que incluyen fagocitosis, estallido respiratorio, degranulación y generación de trampas extracelulares de neutrófilos. Sin embargo, los mismos factores pro-inflamatorios y moléculas microbidas liberadas por los PMN para asegurar la protección inmune del huésped frente a la infección por *Mtb* podrían ser perjudiciales y causar daño tisular. Por lo tanto, la información acerca del rol de los neutrófilos en la protección frente a tuberculosis y la patología es altamente contradictoria, mientras que algunos le atribuyen un papel clave sobre el control de la enfermedad, otros los asocian con la exacerbación de la patología.

Evidencia reciente demuestra que los distintos genotipos de *Mtb* con capacidad de infectar numerosos individuos modularían la respuesta inmune innata a través de diferentes mecanismos de evasión. En función de ello, el **objetivo general de este trabajo de tesis** es investigar la participación del epitelio bronquial en el

establecimiento y desarrollo de la respuesta inmune frente a diferentes genotipos de *Mtb* prevalentes en Argentina y su interacción con otras células inmunocompetentes, en este caso los PMN, en el contexto de la infección.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

**1. Estudiar la respuesta funcional del epitelio bronquial humano frente a la infección con la cepa local M de *Mtb* multirresistente a drogas y la cepa de referencia H37Rv:**

- i. Fagocitosis y/o adherencia del patógeno al epitelio bronquial humano
- ii. Replicación intracelular del patógeno
- iii. Muerte celular del epitelio bronquial infectado
- iv. Expresión de receptores de reconocimiento y entrada involucrados
- v. Factores solubles secretados

**2. Estudiar la interacción epitelio bronquial-PMN en el contexto de la infección con las cepas de *Mtb* M y H37Rv:**

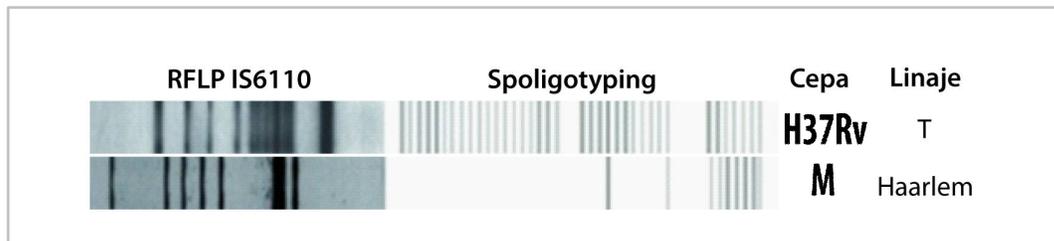
Se evaluará el impacto de los medios condicionados derivados de cultivos de epitelio bronquial infectado con la cepa M o H37Rv sobre la funcionalidad de los PMN en términos de:

- i. Quimiotaxis celular
- ii. Activación celular en términos de producción de especies reactivas del oxígeno, expresión del receptor CD11b, generación de NETs
- iii. Respuesta a citoquinas y otros mediadores solubles
- iv. Sobrevida de PMN
- v. Entrada y replicación intracelular del patógeno
- vi. Muerte celular
- vii. Secreción de factores solubles post-infección

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

En este trabajo se utilizó el aislado clínico 6548 de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) multirresistente a drogas (MDR) que pertenece a la colección permanente del Laboratorio del Servicio de Micobacterias del INEI-ANIS “Carlos G. Malbrán” en Buenos Aires. El mismo fue aislado durante el brote MDR e identificado en base a su perfil de *spoligotyping* y RFLP de la secuencia de inserción *IS6110* como representativo del *cluster* M (perteneciente al familia Haarlem subtipo H2). Además, se utilizó la cepa de referencia H37Rv (familia T) provista gentilmente por la Dra. I.N. de Kantor (TB laboratory, INPPAZ PAHO/WHO). Las cepas fueron crecidas en hasta fase logarítmica en medio Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich) suplementado con OADC (Oleico, Albúmina, Dextrosa, Catalasa; Becton Dickinson, USA) durante 15-21 días en estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los agregados bacterianos fueron disgregados mecánicamente con perlas de vidrio en vortex, alicuotados a la concentración de uso (~10<sup>7</sup> bacterias/ml) y almacenadas a -80°C en criotubos hasta su utilización. En la Figura 9 se muestra el *spoligotyping* y patrón RFLP de la secuencia de inserción *IS6110* de las cepas H37Rv y M.



**Figura 9** | *Spoligotyping* y patrón RFLP-*IS6110* de los aislados clínicos de *Mtb* utilizados en este estudio. Cepa de referencia H37Rv y aislado local multirresistente a drogas M (6548).

En algunos experimentos se emplearon también bacilos de *Mtb* H37Rv muertos por irradiación gamma con una dosis de 2,4 KGy (CNEA). La inactivación fue confirmada cultivando las bacterias tratadas en medio agar sólido por 60 días. Los

inóculos fueron ajustados a una densidad óptica 600nm = 1 ( $\approx 10^8$  bacterias/ml) con solución fisiológica (SF) y se almacenaron en freezer a  $-20^\circ\text{C}$ .

### **Línea celular del epitelio bronquial humano: Calu-6**

Se empleó la línea celular del epitelio bronquial humano Calu-6 (ATCC, HTB-56) la cual fue crecida en medio RPMI 1640 (Gibco Lab., NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor, Argentina) inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 5,5 mg/ml de piruvato (Sigma-Aldrich), 100 U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich) y 100 ug/ml de estreptomycin (Sigma-Aldrich) (medio completo). El cultivo celular fue mantenido hasta confluencia o sub-confluencia en botellas cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Corning CellBind, NY, USA) en estufa a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de CO<sub>2</sub>. Llegado este punto se despegó la monocapa celular utilizando una solución 0,5% de tripsina-EDTA (Gibco Lab., NY, USA). Las células colectadas se trataron con SFB para inactivar la tripsina y previo centrifugado se suspendieron en medio RPMI 1640 completo y sembradas a distintas concentraciones en placas de 24, 48 o 96 pocillos (Corning Costar, NY, USA) dependiendo del experimento a realizar.

### **Infecciones de Calu-6 con cepas de *Mtb***

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células por pocillo en placa de 96 pocillos suspendidas en medio RPMI 1640 completo y se cultivaron *overnight* hasta obtener una monocapa con un 90% de confluencia (aproximadamente  $1 \times 10^5$  células por pocillo). Los ensayos que se describen a continuación se llevaron a cabo por triplicado.

**a- Entrada y adherencia:** las células Calu-6 se incubaron con la cepa de *Mtb* de referencia H37Rv y la multirresistente de drogas M a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 bacilos viables por célula epitelial (MOI=5). Luego de 2 horas (h) de infección, las células fueron lavadas cuidadosamente con *buffer* fosfato salino (PBS) 1X tibio entre 3 y 5 veces para eliminar bacteria remanente extracelular. Se le

adicionó luego a cada pocillo 100ul de *buffer* de lisis (SDS 0,1%) por 10 min a temperatura ambiente y seguidamente 100ul de *buffer* de neutralización (BSA 20%). Una alícuota de esa suspensión fue utilizada para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC).

**b- Replicación intracelular del bacilo:** Luego de 2 h de infección con las cepas H37Rv y M (MOI=5), las células fueron lavadas con PBS 1X tibio entre 3 y 5 veces para eliminar bacteria remanente extracelular. Si bien en la literatura se ha descrito el uso de gentamicina para eliminar la bacteria (H37Rv) adherida a membrana o extracelular remanente [120], en este trabajo de tesis se descartó su uso ya que la cepa M es resistente a dicho antibiótico (observaciones personales de la Dra. Beatriz López, Jefa del Servicio de Micobacterias, ANLIS-Malbrán, (Figura suplementaria 1). Por otro lado, las células se suspendieron en medio RPMI 1640 tibio adicionado con 2% de SFB para detener parcialmente la proliferación de Calu-6. Las células infectadas se cultivaron durante 4 días para permitir la replicación intracelular de *Mtb* y posteriormente fueron lavadas entre 3 y 5 veces con PBS 1X tibio a fin de eliminar la presencia de bacterias extracelulares y se procedió a determinar las UFC de la misma manera que en el punto a-.

#### **Obtención de imágenes de Calu-6 infectadas con H37Rv y M por microscopía confocal**

Primeramente, se procedió a marcar las cepas de *Mtb* H37Rv y M con Rodamina incubando duramente 30 minutos (min)  $6,5 \times 10^7$  bacterias/ml de la cepa H37Rv y  $1,25 \times 10^7$  bacterias/ml de las cepa M con Rodamina (5  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma-Aldrich) a 37°C. A continuación, se hicieron entre 3 y 4 lavados (4000 rpm por 10 min) con PBS 1X para eliminar remanentes del colorante.

Por otro lado, se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células Calu-6 en vidrios estériles de 12mm dispuestos en pocillos de placas de 24 wells y se infectaron por 2 h con las

cepas previamente marcadas con Rodamina. Transcurrido el tiempo de infección, las células se lavaron con PBS 1X de 3 a 5 veces para eliminar restos de bacteria extracelular y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente, los vidrios se lavaron nuevamente con PBS 1X y se permeabilizaron las células con Tritón X100 0,3% durante 10 min a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS 1X, se incubaron las células con Faloidina-FITC 0,05 mg/ml (Sigma-Aldrich) por 1 h. Finalmente los vidrios fueron lavados nuevamente con PBS 1X y montados sobre porta objeto que contiene una gota de medio de montaje Poly-mount (Polysciences Inc.) y analizados por microscopia confocal de fluorescencia utilizando un microscopio FV-1000 (Olympus, Tokyo, Japón).

#### **Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC)**

Se empleó el método de placa extendida [121] en el cual se extiende una muestra pequeña sobre la superficie de una placa de Petri estéril con agar que contiene medio adecuado y se incuba hasta que las colonias sean visibles. Se infiere que cada colonia se originó de una bacteria y que el número de colonias detectadas por placa representa a la cantidad de células viables de la muestra en estudio. Para minimizar errores al calcular el tamaño de la población se ha determinado prácticamente que debe haber entre 30 y 300 colonias por placa de cultivo. Por ello, se realizaron diluciones seriadas (1:10) del lisado celular a fin de obtener recuentos confiables de las colonias. Se utilizaron 50 µl de cada dilución para extender en una placa con agar 7H11 (Becton Dickinson) suplementado con OADC realizando duplicados. Luego de 21 días de crecimiento se contaron las colonias y se determinó el número de bacilos viables mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = N / \text{vol} \times \text{dil}$$

UFC/ml: unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra, N: número promedio de colonias obtenidas para una dilución dada, vol: volumen de inóculo en ml y dil: dilución.

### **Obtención de medios condicionados provenientes de Calu-6 infectadas**

Se sembraron  $3 \times 10^5$  células Calu-6 en placa de 24 pocillos hasta 90% de confluencia y se infectaron por 2 h con las cepas de *Mtb* H37Rv y M a una MOI de 5. Seguidamente, fueron lavadas entre 3 y 5 veces con PBS 1X tibio para eliminar la bacteria extracelular remanente y suspendidas en medio RPMI 1640 adicionado con 2% de SFB. Luego de 18 h de incubación a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, se colectó el medio condicionado (MC) derivado de las células epiteliales infectadas con H37Rv (H37Rv-MC) o M (M-MC) y el mismo fue filtrado 2 veces por una membrana de 0,22 µm de poro para asegurarnos de eliminar cualquier traza bacteriana remanente. A modo de control se colectó MC de células sin infectar (Control-MC) cultivadas en paralelo. Los MC obtenidos se conservaron en *freezer* a -80°C hasta su uso.

### **Depleción de TNF-α en H37Rv-MC**

H37Rv-CM fue incubado con el anticuerpo neutralizante para TNF-α (10 µg/ml, clon TNF 104C, ratón IgG2a, Biolegend) por 1 h a 4°C y luego se le adicionó 100 µl/ml de perlas de sefarosa de Proteína G (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden) previamente lavadas. Transcurrida 1 h de incubación a 4°C, H37Rv-CM fue centrifugado (12000 g) con el fin de remover los complejos perlas-anticuerpo antes de utilizar. La depleción fue confirmada por ELISA.

### **Determinación de factores solubles secretados**

Los MC derivados de Calu-6 infectadas o no con las distintas cepas de *Mtb* se utilizaron para medir las citoquinas TNF-α, IL-1β, IL-10, IL-6 y TGF-β y la quimioquina IL-8 por ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (TNF-α, IL-1β, IL-8, TGF-β y GM-CSF eBioscience; IL-10 and IL-6 Biolegend).

### Determinación de actividad metaloproteínasa

Se determinó la actividad metaloproteínasa (MMP), MMP-9, MMP-2 y MMP-1 en los MC derivados de Calu-6 infectados o no con las distintas cepas de *Mtb* por zimografía en gelatina de acuerdo a Elkington y col. [122] con ciertas modificaciones. Para ello, se sembraron 30  $\mu$ l de cada sobrenadante diluido en *Loading buffer* 5X, sobre un gel de gelatina (Tris 1,5 M pH=8.8, Acrilamida 30%, Glicerol 50%, SDS 10%, TMED y APS 10%) previamente polimerizado y con el *Stacking gel* (Agua destilada, Acrilamida 30%, Tris 1M pH=6.8, SDS 10%, APS 10% y TMED) correspondiente gelificado. Luego, el gel se colocó dentro de la celda de corrida conteniendo *Running buffer* TG-SDS 10X 8 (Tris-Base, Glicina, SDS 20% y Agua) y se conectó a una fuente de poder a 20 mA por cada gel. Pasado el tiempo necesario para la separación de las bandas y migración de las muestras, se desconectó la cubeta y se retiró suavemente el gel. Se realizaron cuatro lavados con *buffer* Triton X100 2,5% en agitación y luego se cubrió completamente al gel con *buffer* gelatinasa y se incubó a 37°C. En el caso de MMP-9 y MMP-2 el gel se incubó *overnight* y para la determinación de MMP-1 la incubación fue por 3 días.

Concluido el tiempo de incubación con el *Buffer* gelatinasa, se removió el mismo y se tiñó el gel con *Staining solution* (Etanol 30%, Ácido acético 10%, Formaldehido 1%, *Coomassie Blue* 0.5%, Agua destilada) por 20-25 min en agitación a temperatura ambiente. Se retiró dicha solución y se destiñó luego con *De-Staining solution* (Etanol 30%, Ácido acético 10% y Agua destilada). El gel se mantuvo en agitación con dicha solución la cual se fue renovando hasta observar las bandas color blancas características que muestran la degradación de la gelatina como indicador de actividad metaloproteínasa. Los análisis fueron determinados por adquisición digital de imágenes con transiluminador (BioRad) y cuantificación de las bandas con actividad proteolítica con el *software* del mismo equipo.

### Secreción de lactato deshidrogenasa mitocondrial (LDH)

Para analizar si la infección de las células Calu-6 con las distintas cepas de *Mtb* altera la permeabilidad del epitelio bronquial, se determinó la secreción de la enzima LDH en MC derivados de células Calu-6 no infectadas (control) o infectadas con los aislados de *Mtb* (MOI de 5) (valores experimentales) cultivadas durante 18 h. Se detectó la enzima mediante un método cinético UV utilizando un *kit* comercial (Roche Diagnostics GmbH, Germany) siguiendo las especificaciones del fabricante. La medida específica de LDH fue determinada como la diferencia entre los niveles medidos en el MC derivado de Calu-6 infectadas y las células no infectadas. La máxima secreción de LDH (máx) fue determinada en MC derivados de Calu-6 previamente tratadas con Triton X100 por 15 min a 37°C.

El porcentaje de secreción de LDH fue determinado como:

$$\% \text{ LDH} = \frac{[(\text{DO}_{490} \text{ valores experimentales} - \text{DO}_{490} \text{ Control}) / (\text{DO}_{490} \text{ máx} - \text{DO}_{490} \text{ Control})] * 100}{100}$$

Valores experimentales: Calu-6 infectadas con la cepa H37Rv o M; Control: Calu-6 no infectadas; Máx: Calu-6 tratadas con Tritón X100

### Análisis fenotípico de células Calu-6 por citometría de flujo

Se determinó la expresión en superficie de los receptores de reconocimiento TLR-2, Dectin-1, receptor de manosa (MR), CD11b y CD54 en células Calu-6 infectadas o no con las distintas cepas de *Mtb* de acuerdo a lo descrito previamente. Para ello,  $1 \times 10^5$  células control y las infectadas fueron lavadas cuidadosamente con PBS 1X tibio entre 3 y 5 veces y cosechadas utilizando una solución 0,5% de tripsina-EDTA (Gibco Lab., NY, USA). Una vez obtenido el pellet celular por centrifugación a 200g durante 10 min en una microcentrífuga, las células fueron fijadas con PFA 4% (Sigma-Aldrich) por 20 min a temperatura ambiente, asegurándonos de esta manera la eliminación de restos bacterianos viables en el caso de las células infectadas.

Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1X tibio para descartar restos de PFA, centrifugadas a 200g por 10 min e incubadas durante 30 min a 4°C con los anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluorocromos PE-anti- Dectin-1 (R&D Systems Inc. Mn, USA), PE-anti-manosa receptor (Biolegend Inc., San Diego, CA, USA), FITC-anti-TLR2 (Biolegend Inc.), PE-anti-CD54 (eBiosciences, San Diego, CA, USA) y PE/Cy5-anti-CD11b y sus correspondientes isotipos. Posteriormente, las células marcadas fueron lavadas con PBS, suspendidas en 200 µl de Isoflow™ (BD) y 50 µl de PFA 0,5% en PBS y finalmente fueron analizadas por citometría de flujo (FACS) empleando un citómetro FACScan (Becton Dickinson). Se adquirieron 10.000 eventos específicos en la región de células Calu-6 viables, la cual fue establecida de acuerdo al tamaño y complejidad celular en función de los parámetros *Forward scatter* (FSC) y *Side scatter* (SSC) respectivamente, excluyendo células apoptóticas y *debris*. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa FCS Express (*De novo software*, Los Angeles, CA).

#### **Detección de apoptosis/necrosis inducida por las cepas de *Mtb* sobre Calu-6**

Células Calu-6 control o infectadas con las cepas de *Mtb* (MOI=5, 2 h) fueron cultivadas por 18 h en placa de cultivo de 96 pocillos y posteriormente cosechadas y lavadas para obtener el *pellet* celular. Luego, las células en *pellet* fueron teñidas con el colorante de viabilidad FVD eFluor 780 (eBioscience) y homogeneizadas inmediatamente. Luego de 30 min de incubación a 4°C y protegidas de la luz, las células fueron lavadas con *Binding buffer* 1X (Sigma-Aldrich) y teñidas con Anexina V (kit de Anexina V, Sigma-Aldrich) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las mismas fueron lavadas y fijadas con PFA 1% por 20 min, para luego ser lavadas nuevamente con *Binding buffer* 1X. Finalmente, las células fueron suspendidas en *Isoflow* y adquiridas en el citómetro. Los resultados están expresados como el porcentaje de células positivas para Anexina V y positivas o negativas para FVD eFluor 780.

## **Neutrófilos (PMN)**

### **Dadores sanos**

La sangre periférica (SP) fue obtenida de dadores sanos vacunados con BCG reclutados del Centro Regional de Hemoterapia, Hospital Garrahan, Buenos Aires. Todos los dadores dieron su consentimiento informado por escrito el cual fue debidamente aprobado por la junta de ética de la institución. Se excluyeron aquellos dadores positivos para el VIH y/o la presencia de enfermedades infecciosas o no infecciosas como cáncer, diabetes o terapia con esteroides.

### **Purificación de neutrófilos a partir de sangre periférica**

Se aislaron neutrófilos (PMN) a partir de sangre periférica (SP) de los dadores sanos mencionados anteriormente. Primeramente, se separó el plasma rico en plaquetas de la muestra de sangre y se recompuso el volumen inicial con PBS. Para la eliminación de las células mononucleares, se realizó un gradiente de Ficoll-Hypaque 1,077 g/cm<sup>3</sup> (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 30 min a 400g y 4°C y luego los PMN fueron separados por sedimentación con Dextrán 6% (Pharmacia, Uppsala, Suecia) como se describe en [123], [124]. Los glóbulos rojos residuales se eliminaron mediante lisis hipotónica con agua destilada. Las células presentaron >96% de pureza y los niveles de contaminación con monocitos fue siempre <0,2% evaluado por tinción con anti-CD14 (Biolegend) por FACS. Finalmente, los PMN fueron resuspendidos en medio RPMI 1640 (Gibco Lab., NY, USA) suplementado con 2% SFB (Natocor, Argentina) inactivado con calor y ajustados a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml.

### **Cultivo de PMN con medios condicionados (MC) de Calu-6**

$1 \times 10^5$  PMN fueron tratados por 1,5 h con Control-MC, H37Rv-MC o M-MC y luego estimulados o no por 3h más con H37Rv gamma irradiada (i-H37Rv) en una relación de 5 i-H37Rv:1PMN. En este punto cabe aclarar que solo se empleó la cepa

H37Rv como segundo estímulo específico para evitar posibles diferencias causadas por el genotipo bacteriano. Los PMN cultivados en medio RPMI 1640 adicionado con 2% de SFB (N-T) fueron también incubados con PMA (50 nM por 30 min, Sigma-Aldrich) o TNF- $\alpha$  (20 ng/ml, Biolegend) y se emplearon como controles positivos. Seguidamente, los PMN fueron testeados para la determinación de la expresión del receptor de superficie CD11b y la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs).

### **Determinación de la expresión de CD11b en PMN**

Los PMN tratados o no con los MC fueron incubados durante 3 h solos o en presencia de i-H37Rv en una relación de 5 bacterias por PMN como segundo estímulo y luego se determinó la expresión en superficie de CD11b. Para ello, las células fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD11b PE/Cy5 (eBioscience) durante 30 min a 4°C, lavadas y suspendidas en Isoflow para ser adquiridas en el citómetro de flujo (FACSCan, Becton Dickinson). Se adquirieron 10.000 eventos por condición y los datos fueron analizados con un *software* FCS Express (De Novo Software, USA).

### **Estallido respiratorio: producción de especies reactivas del oxígeno**

Los PMN tratados con los MC fueron posteriormente sometidos a un segundo estímulo con a) PMA 5 nM (Sigma-Aldrich) a 37°C por 30 min o b) i-H37Rv por 3 h en una relación de 5 bacterias por PMN, para inducir el *stress* oxidativo. Para visualizar la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs), los PMN fueron marcados durante los 30 min finales de cada cultivo con Dihidrorodamina 123 5  $\mu$ M (DHR, Sigma-Aldrich) a 37°C, molécula que en presencia de EROs se oxida a rodamina emitiendo fluorescencia por excitación con un láser de 488 nm [125]. En ambos casos, se utilizó PMA 50 nM para estimular los PMN durante 30 min antes de terminar el cultivo junto con la marca DHR a 37°C y utilizarse como control positivo de producción de EROs. Así, los PMN que se desafiaron con PMA 5 nM, se incubaron junto con

DHR. En ambos casos, la estimulación fue detenida incubando las muestras a 4°C y fueron analizadas inmediatamente por FACS. La intensidad de fluorescencia fue medida en FL-1 y se adquirieron 10.000 eventos por condición. Los datos fueron analizados con un *software* FCS Express (De Novo Software, USA).

### **Ensayo de sobrevivencia celular: cuantificación de apoptosis por microscopía de fluorescencia**

Con el fin de evaluar si los MC alteran la muerte de PMN inducida por la cepa de referencia i-H37Rv,  $1 \times 10^5$  PMN fueron sembrados en placas de 96 pocillos y luego estimulados por 3 h con i-H37Rv en una relación de 5 bacterias por PMN. Luego, cada pocillo fue lavado con PBS 1X tibio para eliminar bacterias remanentes y la células se incubaron con los MC durante 18 h a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, los PMN fueron cosechados y 20  $\mu$ l de la suspensión celular fue colocada sobre un portaobjetos junto con 2,5  $\mu$ l del cóctel de tinción preparado mezclando iguales volúmenes de 100  $\mu$ g/ml bromuro de etidio y 100  $\mu$ g/ml de naranja de acridina de acuerdo a Lapponi y col. [126]. Dicha suspensión fue cuidadosamente mezclada y se le permitió reposar por aproximadamente 1 min antes de cubrirla con un cubreobjetos. Se examinó bajo una magnificación de 40X al microscopio de fluorescencia. Las células pudieron ser identificadas como: i) viables: núcleo brillante y verde con su estructura intacta, ii) apoptóticas tempranas: núcleo brillante y verde con condensación de la cromatina identificadas como áreas densas verdes en el núcleo, iii) apoptóticas tardías: núcleo naranja con condensación de la cromatina identificada como áreas naranjas densas, iv) necróticas: núcleo naranja con estructura intacta.

### **Ensayo de formación de trampas extracelulares de neutrófilos**

El ensayo de formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) se llevó a cabo según Lapponi y col.  $4 \times 10^5$  PMN fueron sembrados en placas de 24 pocillos (Corning) que contenían cubreobjetos de 12 mm recubiertos con poli-L-lisina

(Sigma-Aldrich), se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de la estimulación con PMA 50 nM o con los MC derivados de Calu-6 infectadas o no con las cepas de *Mtb* por 3 h, la formación de NETs fue visualizada por microscopía confocal de fluorescencia y el ADN liberado se cuantificó en los sobrenadantes por fluorimetría utilizando *Sybr Gold* [125].

**Ensayo de inmunofluorescencia:** luego de la estimulación, las células se fijaron con PFA 1% durante 10 min y se lavaron 3 veces con PBS 1X. Posteriormente, se permeabilizaron con Tritón 0,1% y se bloquearon con suero de cabra 2%. Las células fueron marcadas con un anticuerpo un anticuerpo anti-elastasa de neutrófilos humana hecho en conejo. El anticuerpo anti-elastasa fue reconocido con un anticuerpo secundario anti conejo hecho en cabra y marcado con Alexa Fluor 546 y el ADN fue marcado con Ioduro de Propidio (2mg/ml). Los vidrios fueron montados en un portaobjetos con una gota de líquido de montaje Polymount y analizados por microscopia confocal de fluorescencia utilizando un microscopio FV-1000 (Olympus, Tokyo, Japón), equipado con un objetivo Plapon 60X/NA1.42.

**Cuantificación del ADN extracelular:** el ADN liberado de los PMN fue digerido con nucleasa micrococcal (500 mU/ml) que cliva los segmentos internucleosomales del ADN en presencia de Ca<sup>2+</sup> (1,5 mM). Luego de 15 min, se adicionó 5 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para detener la reacción enzimática. Por último, los sobrenadantes fueron recolectados y centrifugados y el ADN se midió utilizando *Sybr Gold* en un fluorómetro (Biotek, Winooski, VT, USA). La curva de calibración se realizó en paralelo utilizando ADN de timo de concentración conocida.

### Determinación de P-p38 intracitoplasmática en PMN

Debido a que diversas citoquinas y quimioquinas pueden fosforilar p38 MAPK en PMN [127], [128] y con el fin de determinar posibles vías de señalización involucradas en la activación de los mismos, se midió la expresión intracitoplasmática de P-p38 por citometría de flujo en PMN tratados con los MC durante 5 min. Luego de la incubación, se cosecharon las células, se lavaron para obtener el *pellet* celular y se fijaron las células con PFA 1% durante 20 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de fijación, se lavaron nuevamente las células con PBS 1X y se procedió a permeabilizarlas con Perm2 (BD) por 15 min. Seguidamente, los PMN se lavaron con PBS 1X y se marcó el pellet celular con el anticuerpo FITC-anti-P-p38 (Santa Cruz Biotechnology) por 30 min a 4°C. Finalmente, los PMN se lavaron y se resuspendieron en *Isoflow* para ser adquiridos en el citómetro.

### Ensayo de fagocitosis en PMN

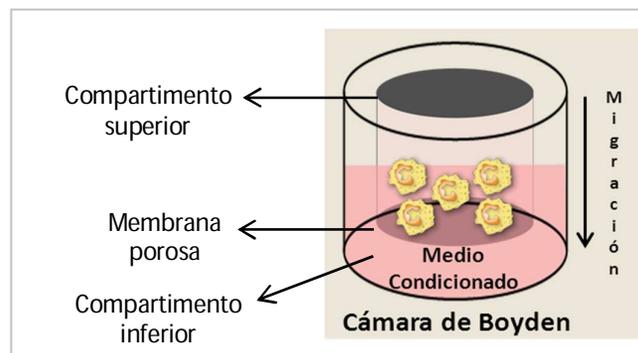
Se determinó si los PMN expuestos previamente o no a Control-MC o MC derivados de Calu-6 infectadas con las distintas cepas de *Mtb* presentaban una alteración en su capacidad para fagocitar bacilos de *Mtb*. Dicho ensayo se realizó midiendo la entrada de bacilos de i-H37Rv marcados con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo el protocolo de Balboa y col. [129]. La i-H37Rv-FITC se obtuvo marcando  $10^8$  bacterias con 0,5 mg de FITC/ml (Sigma Chemical Co.) en PBS 1X a temperatura ambiente por 1 h; luego fueron lavadas las veces que sean necesarias hasta remover el FITC no unido y resuspendidas en medio RPMI 1640 con 10% SFB.

Para el ensayo de fagocitosis,  $1 \times 10^5$  PMN previamente incubados con los distintos MC por 1,5 h fueron estimulados con i-H37Rv-FITC (relación de 5 i-H37Rv-FITC: 1 PMN) por 1 h a 37°C para permitir su fagocitosis. Una vez finalizada la incubación con i-H37Rv-FITC, los PMN se lavaron con PBS 1X para remover la

bacteria extracelular y el porcentaje de células que fagocitaron i-H37Rv-FITC fue determinado por citometría de flujo. En paralelo, se realizaron controles negativos de fagocitosis incubando a las suspensiones de PMN con 5 µg/ml de Citocalasina B (Sigma-Aldrich), inhibidor de la fagocitosis, media hora antes del agregado de i-H37Rv-FITC.

### **Ensayo de quimiotaxis de PMN**

Los PMN frescos fueron suspendidos en medio RPMI 1640 suplementado con 2% SFB a una densidad de  $1 \times 10^5$  PMN/ml. Luego, cada suspensión celular fue colocada en la parte superior de cada uno de los 18 micro-pocillos de la cámara de *Boyden* (Figura 10) (Neuro Probe Inc., Bethesda, Maryland, USA). Se colocó una membrana de polivinilpirolidone (PVP) libre de policarbonato de 3 µm de tamaño de poro (Poretics Products, Livermore, California, USA) para separar los PMN de los pocillos inferiores que contienen los MC de Calu-6 utilizados para evaluar su capacidad como quemoattractantes o una solución de fMLP  $10^{-7}$  M como control positivo. En cualquiera de los dos casos, la cámara fue incubada por 30 min a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de la incubación, la membrana fue fijada y teñida con el *kit* Tinción 15 (Biopur Diagnostics) para permitir la visualización de los PMN migrados. El número de PMN migrados en la superficie inferior de la membrana observados al microscopio óptico (*High Power Field* 1000X) fue determinado contando 5 campos al azar (X400) para cada condición en triplicado.



**Figura 10** | Modelo esquemático de la cámara de Boyden

### **Determinación de entrada y replicación de H37Rv en PMN**

$1 \times 10^5$  PMN cultivados en RPMI 1640 adicionado con 10% de SFB fueron sembrados en placa de 96 pocillos previamente tratados con poly-L-lisina (Sigma-Aldrich) para permitir su óptima adherencia e incubados por 18 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> de acuerdo a Morris y col. [130]. Luego, se removieron las células no adheridas lavando con PBS 1X tibio y los PMN adheridos a las placas se incubaron con 100 µl de los distintos MC. Al cabo de 30 min de incubación, los PMN fueron infectados con H37Rv (MOI=3). Transcurrida 1 h para permitir su fagocitosis, las células fueron lavadas para eliminar restos de bacteria extracelular remanente. Para la determinación de la entrada/adherencia bacteriana, se agregó a los PMN inmediatamente *buffer* de lisis (SDS 0,1%) por 10 min a temperatura ambiente y se adicionó luego *buffer* de neutralización (BSA 20%). A fin de determinar las UFC, para cada condición de tratamiento /infección, una alícuota de cada condición fue sembrada en placas de agar 7H11/OADC (Becton Dickinson) y se contaron las colonias luego de 21 días de crecimiento de la cepa H37Rv. Para el caso de la internalización, luego de los lavados con PBS 1X, se adicionó a cada condición 100ul de medio de cultivo RPMI 1640, 5% SFB suplementado con gentamicina (Sigma-Aldrich) para eliminar las bacterias extracelulares remanentes durante las siguientes 22 h, momento en el cual se procede a lisar los PMN y sembrar en agar 7H11/OADC las distintas alícuotas, de la misma manera que se mencionó anteriormente para la determinación de la UFC.

### **Detección de apoptosis/necrosis inducida por H37Rv sobre PMN**

Los PMN infectados o no con H37Rv (MOI=3) por 1 h, fueron cultivados por 18 h más, cosechados de la placa de cultivo de 96 pocillos y lavados para obtener el *pellet* celular. Luego, las células fueron teñidas con el colorante de viabilidad FVD eFluor 780 (eBioscience) y homogeneizadas inmediatamente. Luego de 30 min de incubación a 4°C y protegidas de la luz, las células fueron lavadas con *Binding buffer*

1X (Sigma-Aldrich) y teñidas con un *kit* de Anexina V (Sigma-Aldrich) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego del tiempo de incubación de la Anexina V, las células fueron lavadas y fijadas con PFA 1% por 20 min, para luego ser lavadas nuevamente con *Binding buffer* 1X. Finalmente, las células fueron suspendidas en *Isoflow* y adquiridas en el citómetro. Los resultados están expresados como el porcentaje de células positivas para Anexina V y positivas para FVD eFluor 780.

### **Generación de medio condicionado de PMN infectados con H37Rv**

En una placa de 96 pocillos previamente recubiertos con poly-L-lisina (Sigma-Aldrich) se sembraron  $1 \times 10^5$  PMN y se permitió su adherencia en medio RPMI 1640 con 10% SFB. Luego, se descartó el medio de cultivo en el que se encontraban y se los incubó por 1,5 h con MC derivado de Calu-6 control o infectadas con las distintas cepas de *Mtb*. Los PMN previamente tratados o no se infectaron con H37Rv MOI=3 por 1 h. Seguidamente, se lavó cada pocillo con PBS 1X tibio cuidadosamente y se añadió medio de cultivo RPMI 1640 adicionado con 5% SFB suplementado con gentamicina (Sigma-Aldrich) para eliminar las bacterias remanentes extracelulares y se incubó por 18-22 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se seleccionó este tiempo de cultivo teniendo en cuenta que los PMN aún permanecen viables y es suficiente para permitir un ciclo de replicación del *Mtb*. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, se filtró por membrana de 0,22 µm y se procedió a medir: actividad MPO, secreción de LDH y de la quimioquina IL-8 y producción de especies reactivas del nitrógeno.

### **Determinación de secreción de lactato deshidrogenasa (LDH) por PMN**

Para analizar el efecto de la infección por *Mtb* sobre la permeabilidad celular de los PMN, la secreción de LDH fue determinada en los sobrenadantes de PMN estimulados (valores experimentales) o no (*low control*) con los diferentes MC por 1,5 h e infectados o no con H37Rv con una MOI=3 por 1 h (valores experimentales). Los

PMN infectados fueron lavados suavemente con PBS 1X tibio y cultivados por 18 h en RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB y gentamicina (Sigma-Aldrich).

La secreción máxima de LDH (*high control*) fue determinada tratando las células con Triton X100 por 15 min a 37°C. Luego, los sobrenadantes fueron recolectados, filtrados dos veces por 0,22 µm de membrana y los niveles de LDH fueron medidos con un *kit* método cinético UV (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

El porcentaje de LDH secretado fue calculado de la misma manera que se determinó para las Calu-6.

### **Actividad Mieloperoxidasa**

Se tomaron 50 µl del sobrenadante de PMN generado anteriormente correspondiente a cada tratamiento con los MC (H37Rv-MC o M-MC o no (Control-MC) y luego infectados con H37Rv, y se colocaron en una placa de 96 pocillos junto con 50 µl de sustrato TMB de alta sensibilidad (Pierce Thermo calidad ULTRA) y se dejó transcurrir la reacción durante unos minutos hasta observar coloración azul. Paralelamente, se desarrolló una curva de calibración de actividad mieloperoxidasa (MPO) para la posterior cuantificación junto con los controles, negativo (RPMI 1640 5% SFB) y positivo (PMN tratados con Tritón X100 0,5%). Finalmente, se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se leyó la absorbancia a 450nm-570nm.

### **Determinación de IL-8 secretado por PMN**

Los PMN estimulados o no con los diferentes MC fueron infectados o no con H37Rv (MOI=3) y posteriormente cultivados por 18 h. Luego, los sobrenadantes fueron colectados y filtrados dos veces por 0,22 µm de membrana. La secreción de IL-8 fue determinada en dichos sobrenadantes por ELISA.

## **Medida de la producción de óxido nítrico en sobrenadantes de PMN**

La producción de óxido nítrico (NO) por PMN que fueron tratados o no con los MC e infectados con H37Rv a una MOI de 3 por 1 h o 18 h de cultivo fue medida utilizando un método indirecto basado en la medida de la concentración de nitritos en los sobrenadantes de cultivo de acuerdo a la reacción de *Griess* [131]. La concentración de nitritos fue determinada mediante análisis espectrofotométrico a 540nm a través de la extrapolación de los valores de una curva estándar preparada en paralelo de concentraciones conocidas. Los productos del óxido nítrico fueron expresados como  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo.

## **Análisis estadístico**

### **Estadística descriptiva**

Las determinaciones de estadística descriptiva (media, mediana, intervalo de confianza, etc.) fueron realizadas alternativamente con los programas Excel (Microsoft) y Prism (GraphPad Software Inc.).

### **Inferencia estadística**

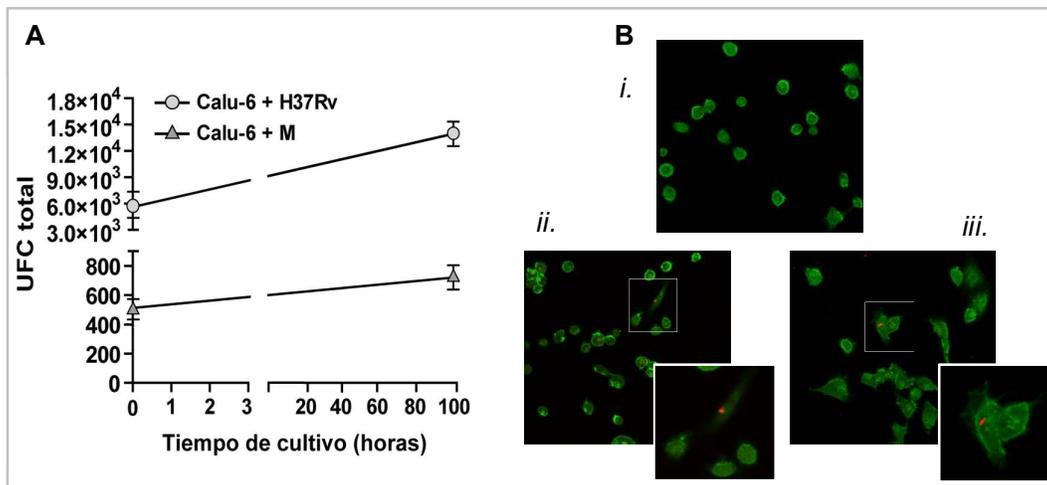
Los resultados entre los distintos tratamientos fueron analizados usando el análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de Wilcoxon para comparar entre cada par de grupos de tratamientos. El nivel de significancia adoptado fue de  $p < 0.05$ .

# **RESULTADOS**

**PARTE I: Efecto directo de las cepas H37Rv y M sobre el epitelio bronquial humano.**

**La cepa M es menos efectiva para invadir pero sobrevive dentro del epitelio**

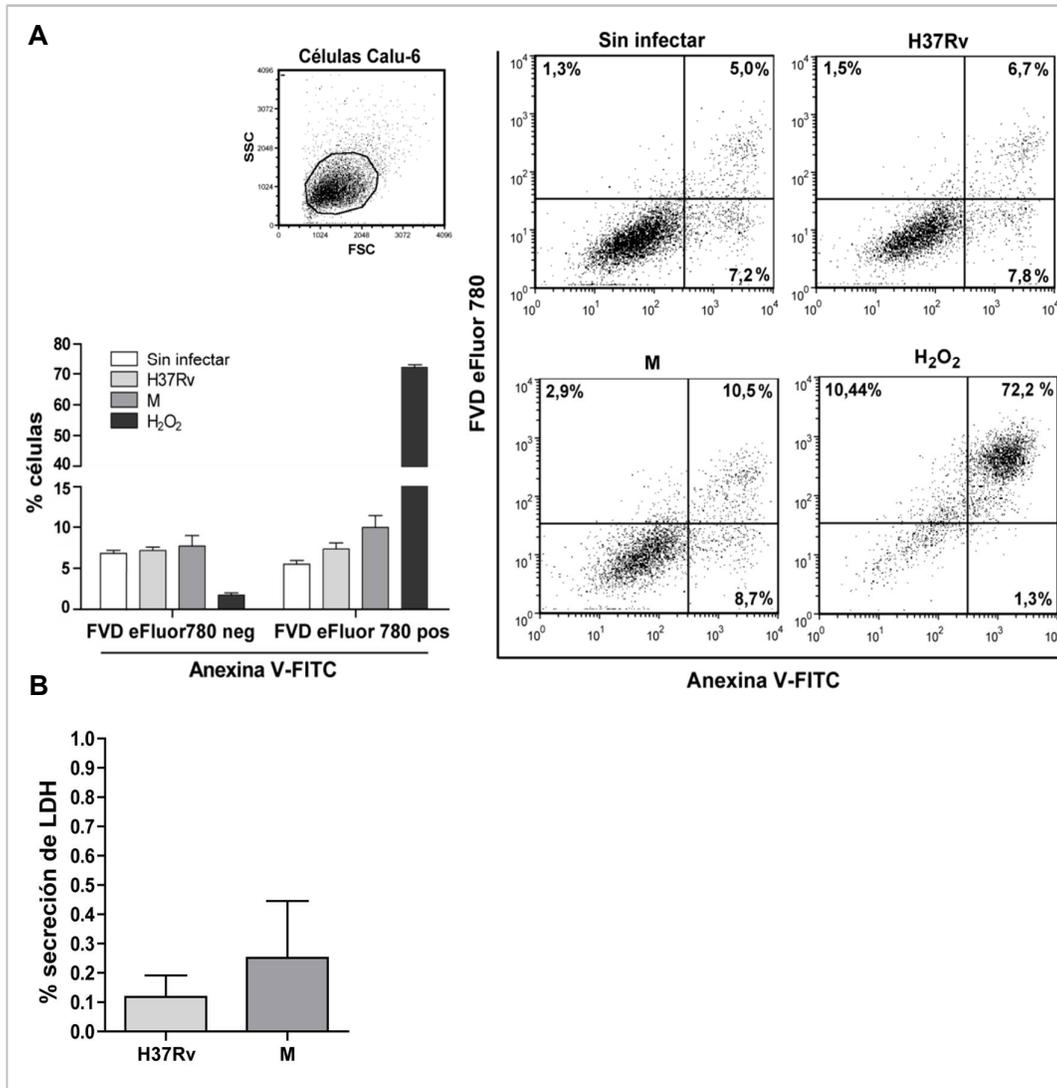
Si bien es ampliamente reconocido que el *Mtb* es un patógeno intracelular que inicialmente invade a macrófagos alveolares y otras células fagocíticas del hospedador, han surgido trabajos que demuestran que el bacilo es capaz de adherirse e invadir *in vitro* a células del epitelio respiratorio [132]–[134]. De hecho, Hernández-Pando y col. [80] han demostrado la presencia de ADN micobacteriano en células pulmonares humanas. En función de ello, nos propusimos evaluar la capacidad de las cepas de *Mtb* H37Rv y M para adherir, invadir y replicar dentro de células no fagocíticas de la línea celular del epitelio bronquial humano Calu-6. Como se observa en la Figura 11A, ambas cepas de *Mtb* fueron capaces de adherirse e invadir a las células del epitelio bronquial Calu-6 aunque la cepa M lo hizo en menor medida que la H37Rv, tal como se pudo detectar en los ensayos de UFC. Interesantemente, aunque ambas cepas tienen potencial para infectar y sobrevivir dentro del epitelio bronquial, la cantidad de bacteria recuperada luego de 96 h post-infección fue marcadamente menor para la cepa M en comparación con la H37Rv. Estos resultados sugieren que la cepa M es menos eficiente para invadir y replicar sin embargo, es capaz de sobrevivir dentro del epitelio bronquial.



**Figura 11 | Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* invaden y replican dentro de Calu-6. A.** Monocapas confluentes de Calu-6 fueron infectadas con las cepas H37Rv o M a una MOI de 5 por 2 h, cosechadas y lisadas para determinar la entrada bacteriana o fueron cultivadas por 96 h más para permitir la replicación intracelular del bacilo. Las células fueron lisadas en cada tiempo correspondiente y diluciones seriadas de las suspensiones fueron plaqueadas para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados se expresaron como UFC totales y la figura muestra las medias  $\pm$  el error estándar de los ensayos (n=6). **B.** Imágenes de fluorescencia muestran monocapas de Calu-6 (verde) sin infectar (*i*) o infectadas con la cepa H37Rv (*ii*) o M (*iii*) previamente marcadas con Rodamina (rojo) a una MOI de 10 por 2 h. Los vidrios fueron montados sobre medio de montaje Polymount y observados al microscopio confocal.

### Las cepas de *Mtb* no inducen apoptosis/necrosis ni alteran la permeabilidad celular en Calu-6

Se ha sugerido que la supresión de la muerte por apoptosis en las células hospedadoras por el *Mtb* podría representar una estrategia de supervivencia del mismo. Sin embargo, se ha demostrado también que la infección con la cepa H37Rv de *Mtb* induce necrosis en células del epitelio alveolar [135]. Por ello, nos propusimos investigar si las cepas H37Rv y M difieren en su capacidad para causar apoptosis y/o necrosis en Calu-6. Como se puede observar en los *Dot Plots* de la Figura 12A, ambas cepas produjeron un leve aumento en el porcentaje de apoptosis temprana (Anexina V positivas/FVD eFluor 780 negativas) y tardía (Anexina V positivas/FVD eFluor 780 positivas) sobre Calu-6, pero no indujeron necrosis directamente (Anexina V negativas/FVD eFluor 780 positivas) a una MOI de 5 o incluso a una MOI de 50 (Figura suplementaria 2).



**Figura 12 | Las cepas de *Mtb* no inducen muerte en Calu-6.** Monocapas de Calu-6 fueron infectadas con las cepas H37Rv o M a una MOI de 5 por 2 h y se permitió la replicación intracelular por 18 h más para determinar la muerte celular midiendo **A.** Expresión de Anexina V y FVD eFluor 780 por citometría de flujo. Los resultados son expresados como porcentaje de células apoptóticas tempranas (Anexina V pos/FVD eFluor 780 neg), apoptóticas tardías (Anexina V pos/FVD eFluor 780 pos) o células necróticas (Anexina V neg/ FVD eFluor 780 pos). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue usada como control positivo. *Dot Plots* representativos demostrando la estrategia de selección de células Calu-6 y gráfico de barras con la cuantificación y media  $\pm$  el error estándar se muestran (n=5). **B.** Determinación de la secreción de LDH en el medio condicionado derivado de Calu-6 18 h post-infección con la cepa H37Rv (H37Rv-MC) o M (M-MC) fueron testeados para secreción de LDH empleando un *kit* cinético UV. Se realizaron triplicados por cada condición. El porcentaje de LDH liberado fue calculado como se describe en materiales y métodos. Los resultados son expresados como las medias  $\pm$  el error estándar de los ensayos (n=8).

Otra medida de la muerte celular está dada por el incremento en la permeabilidad de la membrana celular [86]. Por ello, analizamos el efecto de la

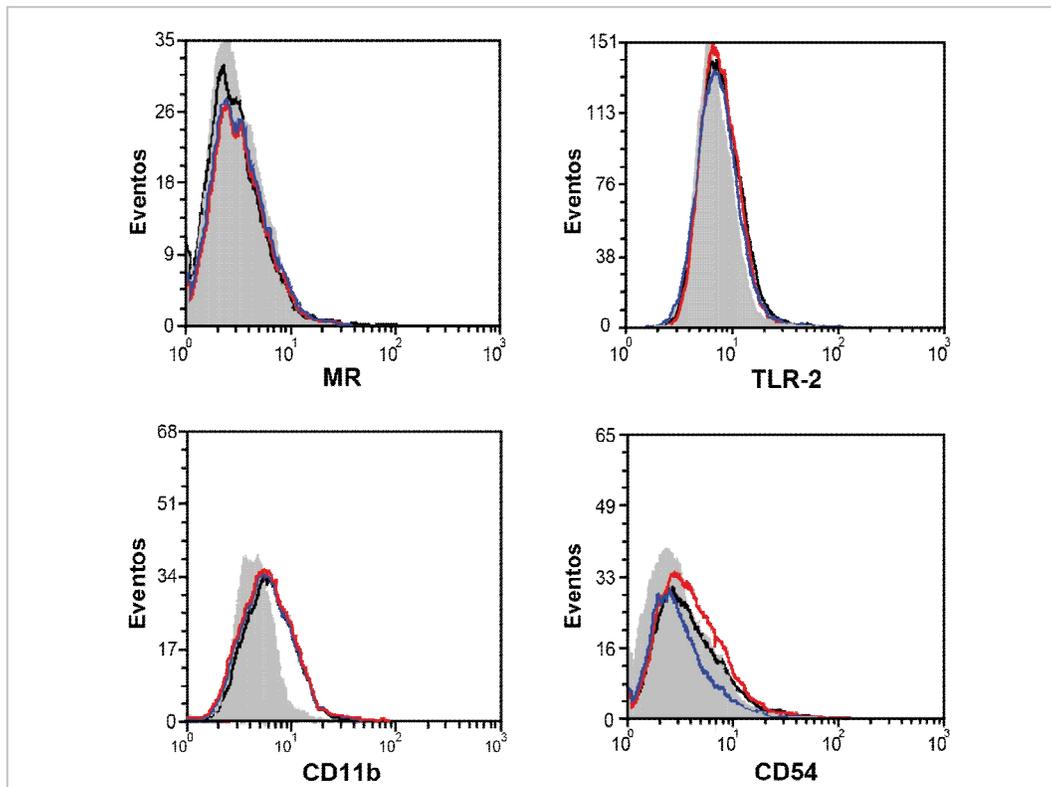
infección sobre la secreción de LDH, factor soluble indicativo de permeabilidad celular, en los MC derivados de Calu-6 infectadas o no con las cepas de *Mtb* luego de 18 h de cultivo post- infección. Como se muestra en la Figura 12B, y en concordancia con los datos de apoptosis, la secreción de LDH fue despreciable.

De acuerdo a nuestros resultados, podríamos concluir que las distintas cepas de *Mtb* infectan al epitelio bronquial evitando un proceso rápido de muerte celular del epitelio por apoptosis/necrosis siendo este hecho independiente de la cepa infectante.

### **Las cepas de *Mtb* no alteran la expresión de receptores de superficie en Calu-6**

La adhesión de los patógenos a las células epiteliales del tracto respiratorio constituye un requisito fundamental para la colonización y posterior infección por parte de los mismos [136], [137]. En este contexto, el epitelio respiratorio juega un papel importante puesto que a través de la identificación de los microorganismos por receptores especializados, conduce a la iniciación de la respuesta inflamatoria que incidirá en la respuesta inmune desarrollada por el hospedador [138], [139]. Se ha establecido que las células del epitelio bronquial humano son capaces de reconocer numerosos PAMPs a través de receptores de reconocimiento de patrones que permiten una rápida respuesta a una amplia variedad de patógenos [140]. Por ello, evaluamos la expresión de algunos receptores de reconocimiento tales como TLR-2, receptor de manosa (MR), CD11b en Calu-6 infectadas o no con *Mtb* luego de 18 h de cultivo. Además determinamos la expresión de la molécula de adhesión CD54, involucrada en el tráfico leucocitario hacia el epitelio pulmonar [141]. Como se observa en los histogramas mostrados en la Figura 13, en todos los casos analizados se registró una expresión casi nula de MR y TLR-2 y una baja expresión de CD11b y CD54 en Calu-6 respecto a su correspondiente control, no observándose diferencias significativas entre las distintas condiciones: no infectadas, infectadas con H37Rv o M. Esto podría sugerir que aunque las superficies mucosas están regularmente expuestas a microbios tanto patógenos como no patógenos, su reconocimiento debe encontrarse

finamente controlado para evitar una exacerbada activación permanente, lo cual va correlacionado con la baja o nula expresión de los marcadores evaluados.



**Figura 13 | Expresión de receptores de superficie en Calu-6.** Las monocapas celulares de Calu-6 fueron infectadas o no con las cepas H37Rv o M a una MOI de 5 por 2 h y luego cultivadas por 18 h más. Las células fueron cosechadas y marcadas con anticuerpos específicos para determinar la expresión de CD11b, TLR-2, receptor de Manosa (MR) y CD54 por citometría de flujo. Se muestran los histogramas representativos de un total de 8 experimentos: células no infectadas: negro, infectadas con H37Rv: rojo e infectadas con M: azul o los controles de isotipo correspondientes en gris relleno.

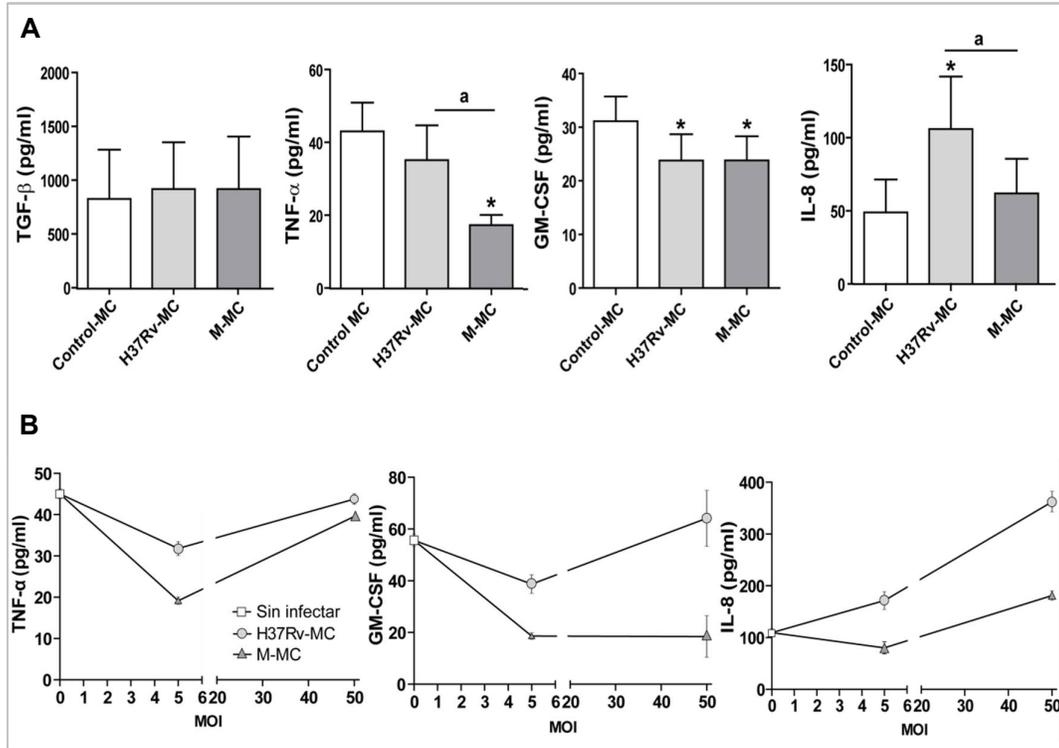
### **La cepa M disminuye la secreción de TNF- $\alpha$ y GM-CSF e induce bajos niveles de secreción de IL-8 en Calu-6**

El epitelio pulmonar no solo actúa como barrera física para prevenir la infección, sino que juega un importante papel como modulador de la respuesta inmune mediante la secreción de una variedad de factores solubles cuyo rol consiste en neutralizar y/o matar a los microorganismos invasores y células infectadas [64]. Además las células epiteliales bronquiales producen citoquinas pro o anti-inflamatorias, factores de crecimiento y quimioquinas que reclutan y activan a células

inmunocompetentes de la inmunidad innata y adaptativa modulando así el inicio de una respuesta inmune efectiva. En función de ello, nos planteamos evaluar los niveles de secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF y TNF- $\alpha$  y anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$  así como la quimioquina IL-8 en los medios condicionados derivados de Calu-6 no infectadas (Control-MC) o infectadas con la cepa H37Rv (H37Rv-MC) o M (M-MC). En nuestro sistema no pudimos detectar secreción de IL-1- $\beta$ , IL-6 e IL-10 (no mostrado). En cambio, sí fueron detectables altas cantidades de TGF- $\beta$  en Control-MC y MC de células infectadas no observándose diferencias entre los MC (Figura 14A), hecho que resulta esperable ya que es crítico regular la intensidad y la duración de la señalización pro-inflamatoria en el epitelio aéreo; quizás más que en cualquier otro sitio de infección, la inflamación excesiva está asociada con un compromiso respiratorio y debe estar altamente controlada. Interesantemente, los niveles de TNF- $\alpha$  encontrados en Control-MC no aumentaron luego de la infección con H37Rv, mientras que se observó una reducción significativa en los valores de TNF- $\alpha$  luego de la infección con la cepa M. Además, los MC derivados de Calu-6 infectadas con las cepas de *Mtb*, mostraron una inhibición en la secreción de GM-CSF en comparación con las no infectadas, pero no se vieron diferencias entre cepas. Por otro lado, a diferencia de M-MC, los niveles de IL-8 en H37Rv-MC fueron mayores que en Control-MC. Así, M-MC indujo menores niveles de mediadores pro-inflamatorios en comparación con H37Rv en el epitelio bronquial.

Con el objeto de determinar si la baja producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas inducidas por la cepa M era debido a un mecanismo específico de inmunosupresión o simplemente al hecho de que la cepa M es 10 veces menos infectiva que la H37Rv, se determinaron los niveles de TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-8 en los MC derivados de Calu-6 infectadas con una MOI de 50. Como se observa en la Figura 14B, las células infectadas con la cepa M a una MOI de 50 secretaron niveles similares de TNF- $\alpha$  a IL-8 que aquellas infectadas con H37Rv a una MOI de 5 por lo que la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-8 dependería de la cantidad de bacilos infectantes en

las células epiteliales. Por el contrario, a diferencia de H37Rv, M indujo menores niveles de GM-CSF a pesar de la MOI empleada (MOI=50), sugiriendo que esta cepa inhibiría específicamente la secreción de este mediador soluble.

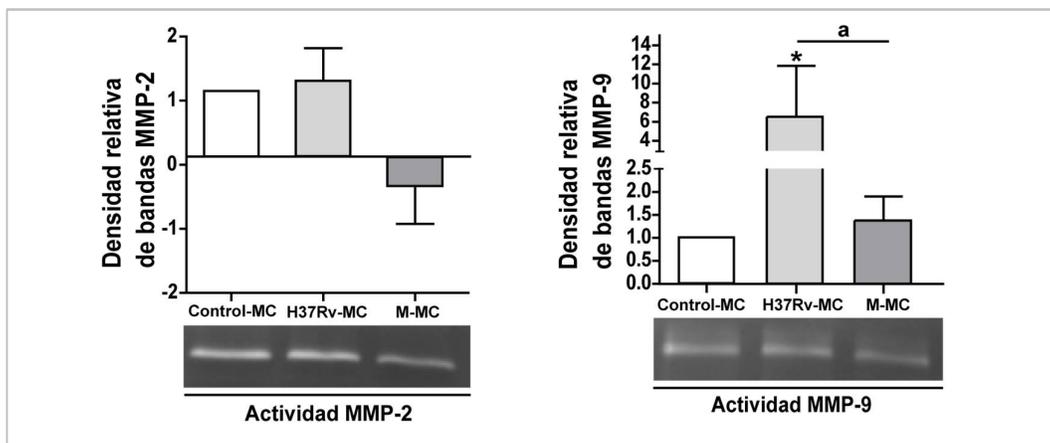


**Figura 14 | Caracterización del medio condicionado derivado de Calu-6 infectadas con *Mtb*.** El medio condicionado (MC) derivado de cultivos de Calu-6 18 h post-infección con la cepa H37Rv (H37Rv-MC) o M (M-MC) fueron testeados para **A.** TGF-β, TNF-α, GM-CSF e IL-8 por ELISA. Los resultados están expresados como pg/ml y se muestran las medias ± error estándar (n=8). Diferencias estadísticas: \* = p<0.05 para H37Rv-MC o M-MC vs. Control-MC, a= p<0.05 para M-MC vs H37Rv-MC. **B.** El medio condicionado (MC) derivado de cultivos de Calu-6 18 h post-infección con la cepa H37Rv (H37Rv-MC) o M (M-MC) a una MOI de 50 o no infectados (Control-MC) fueron testeados para TNF-α, GM-CSF e IL-8 por ELISA. Los resultados están expresados como pg/ml y se muestran las medias ± error estándar (n=4).

### La cepa M induce pobre actividad de metaloproteinasas sobre Calu-6

Se ha demostrado que las metaloproteinasas (MMPs) están implicadas en la inmunopatología de la TB, y las células del epitelio pulmonar representan una potencial fuente de MMPs ya que comprenden aproximadamente el 25% del total de células en el pulmón. Las MMPs constituyen una familia de enzimas proteolíticas que colectivamente, son capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular.

Además, cumplen un rol clave en la inmunidad incluyendo el procesamiento de quimioquinas, destrucción tisular y reclutamiento de células inmunocompetentes al sitio de infección [142]. Es por ello que nos propusimos determinar si las células del epitelio bronquial son capaces de secretar MMPs vía infección directa con las cepas de *Mtb*. Como se puede observar en la Figura 15C, tanto la actividad de MMP-2 como de MMP-9, dos de las MMPs más relevantes en la inmunopatología de la TB, se ven disminuidas en el MC derivado de Calu-6 infectadas con la cepa M, de hecho, la actividad MMP-2 se encuentra inhibida en dicho MC. Interesantemente, la actividad de MMP-9 en M-MC es significativamente menor respecto a H37Rv-MC. Es importante mencionar que también se determinó la MMP-1, la cual no presentó actividad en nuestro sistema.



**Figura 15 | Caracterización del medio condicionado derivado de Calu-6 infectadas con *Mtb*.** C. El medio condicionado (MC) derivado de cultivos de Calu-6 18 h post-infección con la cepa H37Rv (H37Rv-MC) o M (M-MC) fueron testeados para secreción de metaloproteinasas (MMPs) 2 y 9 por zimografía en gelatina. Los resultados están expresados como densidad relativa de las bandas fotografiadas con el transiluminador BioRad y analizadas con el *software* del propio equipo. La cuantificación de la densidad de dichas bandas se muestra en los gráficos de barras así como la media  $\pm$  error estándar. Diferencias estadísticas: \* =  $p < 0.05$  para H37Rv-MC vs. Control-MC, a =  $p < 0.05$  para M-MC vs H37Rv-MC (n=4).

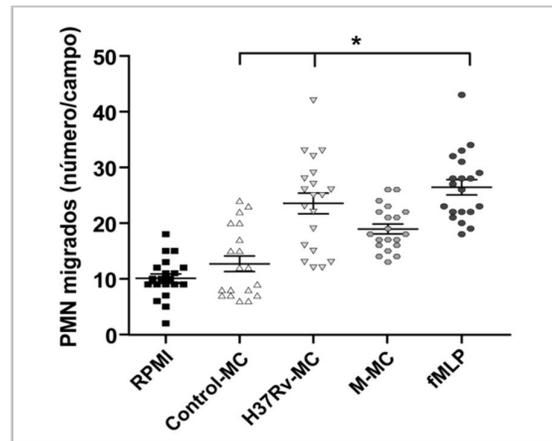
Estos resultados muestran que la cepa M regula negativamente la actividad de MMP-2 y MMP-9 cuando el epitelio bronquial es infectado con dicha cepa. Estos datos podrían sugerir un menor daño tisular inducido por las MMPs presentes en M-MC,

manteniendo así la integridad epitelial, lo cual podría alterar el potencial flujo de neutrófilos y otras células como macrófagos al sitio de infección.

**PARTE II: Alteración de las funciones efectoras de los neutrófilos en el contexto de la infección con *Mtb*.**

**Efecto de la capacidad quimioattractante del medio condicionado derivado de Calu-6 infectadas con la cepa M sobre los PMN**

Sin duda alguna, los PMN están rodeados de una compleja mezcla de moléculas de señalización durante la respuesta inmune. Una vez que los PMN censan una señal, migran hacia el sitio de infección siguiendo un gradiente creciente de mensajeros químicos conocidos como quimioattractantes. Esta migración de PMN, conocida como quimiotaxis, es un componente crucial en el sistema inmune [128]. Las quimioquinas son los factores solubles encargados de establecer un equilibrio entre la liberación o retención de los PMN. Debido a que los PMN circulantes entran al sitio de la infección migrando principalmente a lo largo de un gradiente de IL-8 [143] y, dado que se detectaron diferentes niveles de IL-8 en los sobrenadantes de células Calu-6 infectadas con las cepas H37Rv o M, se propuso evaluar la capacidad quimioattractante de PMN de los MC derivados de Calu-6 infectadas con *Mtb*. Como se muestra en la Figura 16, H37Rv-MC y fMLP (utilizado como control positivo) indujeron un mayor número de PMN migrados que el Control-MC y M-MC; lo cual puede atribuirse parcialmente a los niveles de IL-8 en dichos MC.



**Figura 16 | El medio condicionado derivado de Calu-6 infectadas con la cepa M muestra menos capacidad quimioattractante de PMN.** Capacidad de los MC de atraer PMN en reposo empleando un ensayo de quimiotaxis y fMLP ( $10^7$  M) como control positivo. Los PMN migrados fueron contabilizados por microscopía óptica. Cinco campos al azar por condición (cada condición en triplicado) fueron analizados y los resultados expresados como el número de PMN migrados/campo (medias  $\pm$  el error estándar). Diferencias estadísticas: \* =  $p < 0.05$  para H37Rv-MC o M-MC vs. Control-MC.

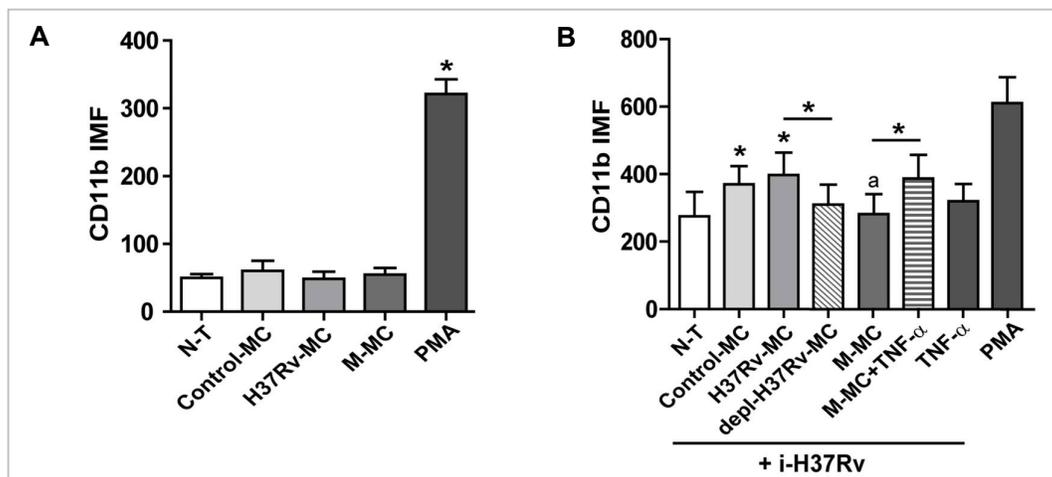
### Los medios condicionados alteran la activación de PMN inducida por i-H37Rv

Una vez que arriban al sitio de infección, los PMN se encuentran con un ambiente inflamatorio enriquecido con citoquinas derivadas del hospedador y quimioattractantes derivados del patógeno que pueden modular su respuesta a un segundo estímulo antigénico. Primeramente evaluamos si los MC ejercían un efecto sobre la expresión de CD11b, receptor que es regulado positivamente luego de la activación de los PMN [144]. Como se muestra en la Figura 17A, el tratamiento de los PMN con los medios condicionados (MC) derivados de Calu-6 control o infectadas (MOI=5) no modificó la expresión de CD11b, mientras que la misma se encontró significativamente aumentada frente al tratamiento con PMA.

Para determinar si los MC son capaces de pre-activar los PMN, dichas células fueron incubadas con los MC y luego expuestas a i-H37Rv como segundo estímulo. Los PMN tratados con Control-MC o H37Rv-MC y luego expuestos a i-H37Rv, mostraron una mayor expresión de CD11b en comparación con los PMN no tratados (N-T), mientras que M-MC no alteró la regulación de CD11b inducida por i-H37Rv

(Figura 17B). Dado que TNF- $\alpha$  es capaz de pre-activar las respuestas funcionales de los PMN [145] y los MC presentan diferentes cantidades de dicha citoquina, nos propusimos evaluar si el aumento de la expresión de CD11b podría deberse a la acción del TNF- $\alpha$  secretado por Calu-6. Para ello, H37Rv-MC depletado de TNF- $\alpha$  o M-MC suplementado con TNF- $\alpha$  fueron utilizados para estimular a los PMN y luego exponerlos a i-H37Rv como segundo estímulo. La depleción de TNF- $\alpha$  de H37Rv-MC resultó en una reducción en la expresión de CD11b cuando los PMN fueron expuestos a i-H37Rv en comparación con H37Rv-MC no depletado. En contraste, el M-MC suplementado con TNF- $\alpha$  indujo un aumento en la expresión de CD11b en PMN en comparación con M-MC.

Estos resultados sugieren que el TNF- $\alpha$  liberado al ambiente extracelular está involucrado en la activación de los PMN, al menos en términos de la expresión de CD11b. Aunque no podemos excluir otros factores solubles que también podrían estar implicados.



**Figura 17 | Los MC alteran la activación inducida por i-H37Rv.** PMN purificados (n=7) fueron incubados por 1,5 h con a) RPMI 1640 (N-T) o con los medios condicionados (MC) derivados de Calu-6 infectadas con H37Rv o M (H37Rv-MC and M-MC) o no infectadas (Control-MC) o b) H37Rv-MC depletado de TNF- $\alpha$  (depl-H37Rv-MC), M-MC adicionado con TNF- $\alpha$  (M-MC-TNF- $\alpha$ ) o TNF- $\alpha$  (20 ng/ml). Después de eso, los PMN fueron estimulados o no por 3 h más con i-H37Rv o PMA (5 nM) como segundo estímulo. PMA (50 nM) fue empleado como control positivo durante los últimos 30 min del cultivo. Los PMN fueron testeados para expresión de CD11b (A y B). Los resultados con expresados como intensidad de fluorescencia media (IFM)  $\pm$  el error estándar. **A.** Diferencias estadísticas: \*= p<0.05 para PMA vs. No tratados (N-T) o PMN tratados con los MC. **B.** Diferencias estadísticas: \*=p<0.05 para

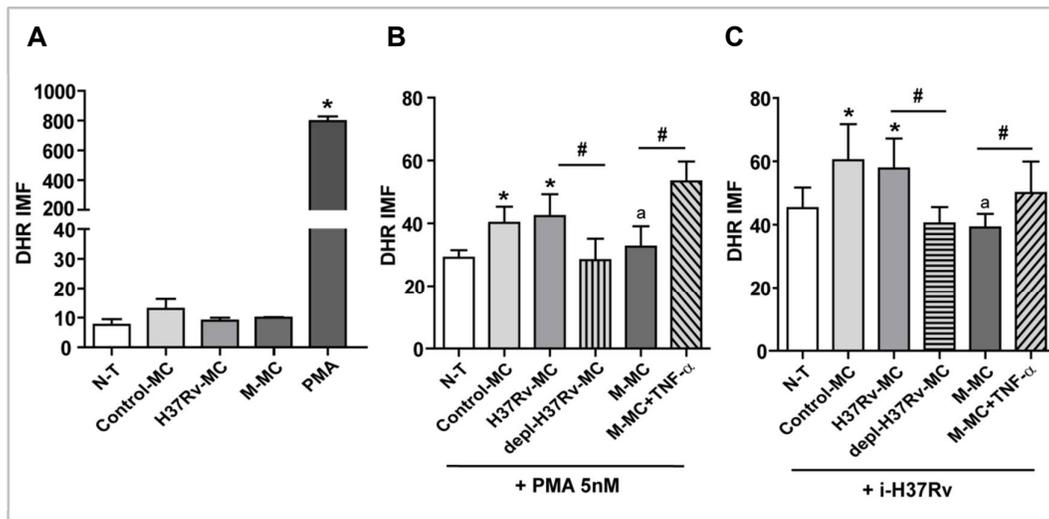
PMN tratados con MC vs. PMN N-T; # =  $p < 0.05$  para PMN tratados con depl-H37Rv-MC vs. H37Rv-MC o PMN tratados con M-MC adicionado con TNF- $\alpha$  vs. M-MC; a =  $p < 0.05$  para M-MC vs. Control-MC o H37Rv-MC.

### **El medio condicionado derivado de Calu-6 infectadas con la cepa M no genera un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno inducida por i-H37Rv en PMN**

Los PMN, así como también otras células fagocíticas contienen la enzima NADPH oxidasa, la cual genera superóxido luego de la activación celular. Las especies reactivas del oxígeno (EROs) derivadas del superóxido, junto con otras proteasas liberadas de los gránulos de los PMN, son capaces de eliminar los microorganismos ingeridos. Tras su activación, los PMN son altamente efectivos a la hora de producir EROs [146] y, es por ello que nos propusimos determinar si los medios condicionados (MC) alteraban la producción intracelular de EROs por los PMN. Para ello, los PMN fueron tratados con los MC y luego estimulados o no con dosis sub-óptimas de PMA o i-H37Rv. Posteriormente se evaluó la producción de EROs por citometría de flujo utilizando la sonda DHR. La exposición de los PMN a los MC resultó en una producción despreciable de EROs, pero dosis óptimas de PMA la aumentaron significativamente (Figura 18A). Sin embargo, los PMN incubados con Control-MC o H37Rv-MC indujeron un aumento en la producción de EROs en respuesta a un desafío subsecuente con dosis sub-óptimas de PMA (Figura 18B) o i-H37Rv (Figura 18C) en comparación con los PMN N-T. Por el contrario, M-MC no fue capaz de aumentar la producción de EROs en respuesta a PMA o i-H37Rv.

Para determinar si TNF- $\alpha$  estaba involucrado en el efecto de pre-activación que ejercen los MC sobre la producción de EROs, los PMN fueron incubados con H37Rv-MC depletado de TNF- $\alpha$  o con M-MC adicionado con TNF- $\alpha$  y luego estimulados con i-H37Rv. La depleción de TNF- $\alpha$  de H37Rv-MC redujo la producción de EROs de los PMN en comparación con aquellos tratados con H37Rv-MC. En cambio, el agregado de TNF- $\alpha$  al M-MC incrementó la producción de EROs respecto al valor observado con

M-MC solo (Figura 18C). Resultados similares se observaron cuando se empleó PMA 5nM como segundo estímulo. Estos resultados sugieren que el TNF- $\alpha$  secretado por las células del epitelio bronquial manipularía indirectamente la producción de EROs por los PMN en respuesta a un segundo estímulo específico e inespecífico. En efecto, la cepa M puede ser capaz de alterar las funciones efectoras de los PMN a través de un efecto indirecto mediante el cual las células del epitelio bronquial infectadas secretan pobres niveles de TNF- $\alpha$ .

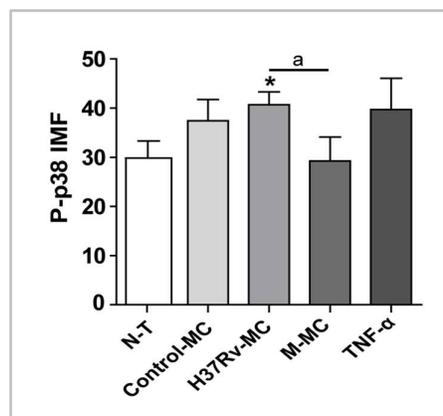


**Figura 18 | Los MC alteran la producción de ERO inducida por i-H37Rv.** PMN purificados (n=7) fueron incubados por 1,5 h con a) RPMI 1640 (N-T) o con los medios condicionados (MC) derivados de Calu-6 infectadas con H37Rv o M (H37Rv-MC and M-MC) o no infectadas (Control-MC) o b) H37Rv-MC depletado de TNF- $\alpha$  (depl-H37Rv-MC), M-MC adicionado con TNF- $\alpha$  (M-MC-TNF- $\alpha$ ) o TNF- $\alpha$  (20 ng/ml). Seguidamente, los PMN fueron estimulados o no por 3 h más con i-H37Rv o PMA (5 nM) como segundo estímulo. PMA (50 nM) fue empleado como control positivo durante los últimos 30 min del cultivo. Los PMN fueron testeados para la producción de ROS mediante la tinción con DHR por 30 min (A, B y C) por citometría de flujo. Los resultados con expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF)  $\pm$  el error estándar. **A.** Diferencias estadísticas: \*= p<0.05 para PMA vs. N-T o PMN tratados con MC. **B y C.** Diferencias estadísticas para PMA y i-H37Rv: \*=p<0.05 para PMN tratados vs. PMN N-T; #=p<0.05 para PMN tratados con depl-H37Rv-MC vs. H37Rv-MC o PMN tratados con M-MC adicionado con TNF- $\alpha$  vs. M-MC; a=p<0.05 para M-MC vs. Control-MC o H37Rv-MC.

### Fosforilación de la p38 MAPK

Otro de los eventos que ocurren intracelularmente durante la activación de los PMN es la rápida inducción de la fosforilación de proteínas de señalización intracelular, las cuales ejercen un rol esencial en la regulación de numerosas

funciones de los PMN. Si bien aún hoy no está bien establecido el papel de las MAPK quinasas en los PMN, se ha demostrado que la exposición de los PMN a la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  induce rápidamente la activación de p38 MAP quinasas (p38 MAPK) [127]. En función de lo mencionado anteriormente, nos propusimos evaluar la expresión de Fosfo-p38 (P-p38) intracelular en PMN estimulados con los MC y dilucidar si podrían tener influencia sobre la activación de p38 MAPK, y por tanto sobre la consecuente activación de los PMN. Como se puede ver en la Figura 19 la expresión de P-p38 en los PMN estimulados con M-MC es equivalente a la de los PMN no tratados (N-T) y significativamente menor en comparación con H37Rv-MC. Estos resultados sugieren que los bajos niveles de TNF- $\alpha$  secretados por el epitelio bronquial infectado con la cepa M podría estar afectando negativamente la señalización intracelular que involucra la fosforilación de p38 MAPK, alterando finalmente la activación de los PMN.

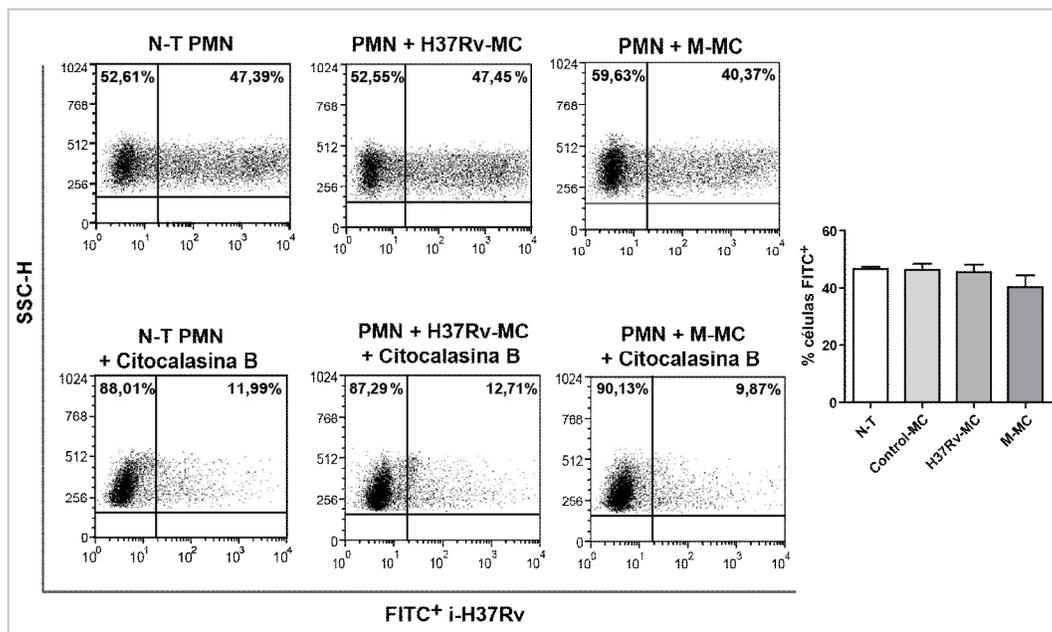


**Figura 19 | Los medios condicionados alteran la fosforilación de la p38 MAPK.** PMN (n=7) fueron estimulados con Control-MC, H37Rv-MC, M-MC o solos (N-T) por 2 min. Luego de ser cosechados, fueron fijados con PFA 1%, permeabilizados (Perm2) y marcados intracelularmente con anti-P-p38 (FITC) para ser adquiridos en el citómetro. Los resultados con expresados como intensidad de fluorescencia media (IFM)  $\pm$  el error estándar. Diferencias estadísticas: \* =  $p < 0.05$  para PMN tratados con H37Rv-MC vs. N-T; a =  $p < 0.05$  para H37Rv-MC vs. M-MC.

### Impacto de los medios condicionados sobre la fagocitosis de i-H37Rv por PMN

Los PMN son rápidos y potentes fagocitos. La fagocitosis ocurre en cuestión de pocos minutos y puede ser reforzada por el sistema del complemento, anticuerpos IgG

así como también por la pre-activación celular [116]. Es por esto último que nos preguntamos si la pre-activación de los PMN con los medios condicionados (MC) alteraba la fagocitosis de i-H37Rv. Para ello, los PMN incubados con los MC fueron cultivados con i-H37Rv-FITC y el porcentaje de células que fagocitaron la bacteria (células FITC<sup>+</sup>) fue determinado por FACS. Como se muestra en la Figura 20, el tratamiento de los PMN con los MC no modificó el porcentaje de células FITC<sup>+</sup>, mientras que la fagocitosis fue de hecho inhibida por el tratamiento con Citocalasina B, sugiriendo que los mediadores solubles secretados debido a la infección no influenciarían la fagocitosis de i-H37Rv por los PMN.



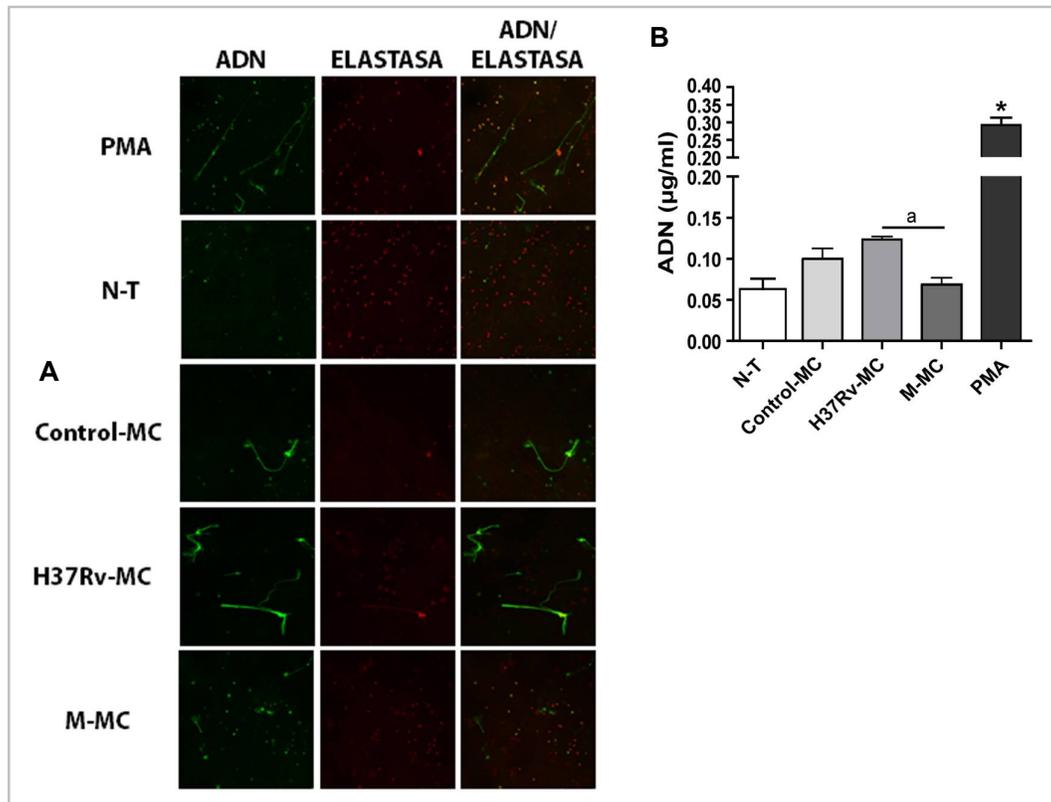
**Figura 20 | Los MC derivados de células del epitelio bronquial infectadas con *Mtb* no modifican la fagocitosis de i-H37Rv por los PMN.** PMN (n=6) fueron cultivados por 1,5 h solos (N-T) o con Control-MC, H37Rv-MC o M-MC en presencia o no de Citocalasina B, fueron incubados por 1 h con i-H37Rv marcada con FITC. Luego, el porcentaje de células que han fagocitado i-H37Rv-FITC fue determinado por FACS. Se muestran las medias  $\pm$  el error estándar de cada ensayo y los *Dot Plots* de un experimento representativo de cada condición.

---

### **Influencia de los medios condicionados sobre la formación de trampas extracelulares de neutrófilos**

Además de los mecanismos conocidos de los PMN para controlar la infección por microorganismos, las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) constituyen otra vía de control capaz de promover la posterior muerte de *Mtb* por macrófagos alveolares residentes [147]. Para determinar si los factores solubles presentes en los medios condicionados (MC) influyen sobre la formación de NETs en los PMN, realizamos estudios de microscopía para visualizar las NETs. Para ello, las células fueron marcadas con Ioduro de Propidio, un colorante de gran afinidad por el ADN, y analizamos su colocalización extracelular con proteínas granulares de los PMN como elastasa que están presentes en estas trampas. Como se observa en la Figura 21A, los PMN no estimulados con los MC (N-T) no indujeron la liberación de ADN de los mismos. Sin embargo, la estimulación de los PMN con los MC promovió la formación de NETs, representadas en la Figura 21A por la presencia de ADN extracelular decorado con elastasa. Como se esperaba, el PMA, utilizado como control positivo, fue el mayor inductor de NETs. Por otro lado, para cuantificar el ADN liberado, se cosecharon los sobrenadantes de las NETs y en ellos se determinó el ADN extracelular por fluorimetría, datos que fueron concordantes con los obtenidos por microscopía (Figura 21B).

El M-MC fue el menor inductor de NETs lo cual se reflejó también en la cuantificación del ADN liberado en comparación con H37Rv-MC.

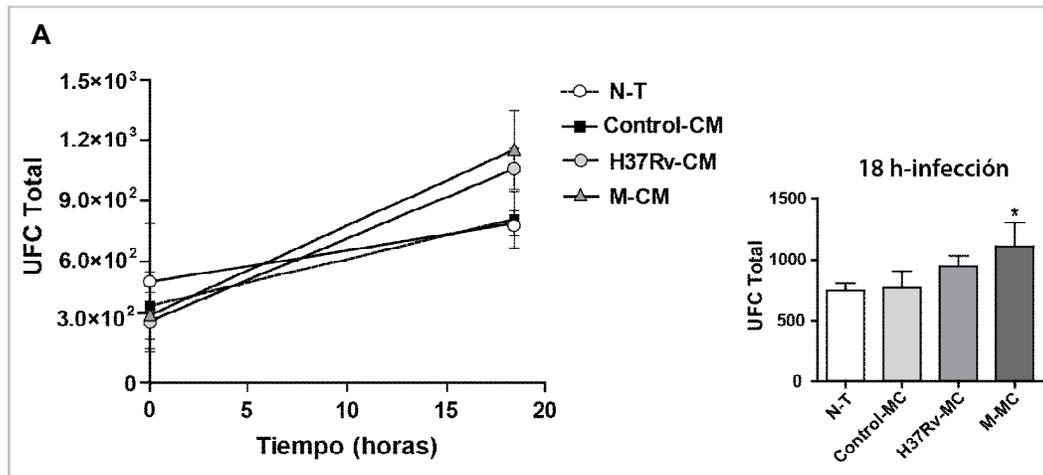


**Figura 21 | Los MC alteran la formación de NETs en PMN.** PMN (n=5) fueron cultivados por 3 h solos (N-T) o con Control-MC, H37Rv-MC o M-MC. Se utilizó PMA (50 nM) como control positivo de generación de NETs. Luego de fijar las células con PFA 4% y lavar los vidrios con PBS1X, se procedió a bloquear y marcar con un anticuerpo anti-elastasa, el ADN fue marcado con Ioduro de propidio (2mg/ml). Los vidrios fueron montados y la formación de NETs fue visualizada por **A.** microscopía confocal de fluorescencia. Se muestran las fotografías de un experimento representativo de 5 totales hechos. **B.** El ADN liberado se cuantificó en los sobrenadantes por fluorimetría utilizando *Sybr Gold* (n=5). Se muestran las medias  $\pm$  el error estándar de cada ensayo. Diferencias estadísticas: \* =  $p < 0.05$  para PMN tratados con PMA vs. PMN estimulados con MC y N-T; a =  $p < 0.05$  para H37Rv-MC vs. M-MC.

### El M-MC induce un aumento en la replicación intracelular de H37Rv en PMN

También nos preguntamos si los MC modificaban la tasa de invasión y replicación de H37Rv en PMN. Para ello, los PMN tratados con los MC fueron infectados con H37Rv y las UFC fueron determinadas a 0 h (entrada) o 18 h (replicación) luego de la infección. Como mostramos en la Figura 22, no se observan diferencias en la entrada de la micobacteria entre los PMN tratados con los distintos MC o aquellos no tratados. Estos resultados van en concordancia con los datos de

fagocitosis. Sin embargo, los PMN expuestos al M-MC fueron más permisivos a la replicación de H37Rv que aquellos no tratados.



**Figura 22 | Impacto de los MC sobre la entrada y replicación de H37Rv en PMN.** PMN (n=7) cultivados por 1,5 h solos (N-T) o con Control-MV, H37Rv-MC o M-MC fueron infectados o no con H37Rv a una MOI de 3 por 1 h. Luego, los PMN infectados o no con H37Rv fueron colectados (0 h) o cultivados por 18 h más. El número de UFC recuperadas a tiempo 0 h (entrada) o 18 h luego de la infección fueron determinadas como se describe en materiales y métodos. Se muestran las medias  $\pm$  el error estándar. Diferencias estadísticas: \* =  $p < 0.05$  para PMN pre-incubados con M-MC vs. PMN N-T.

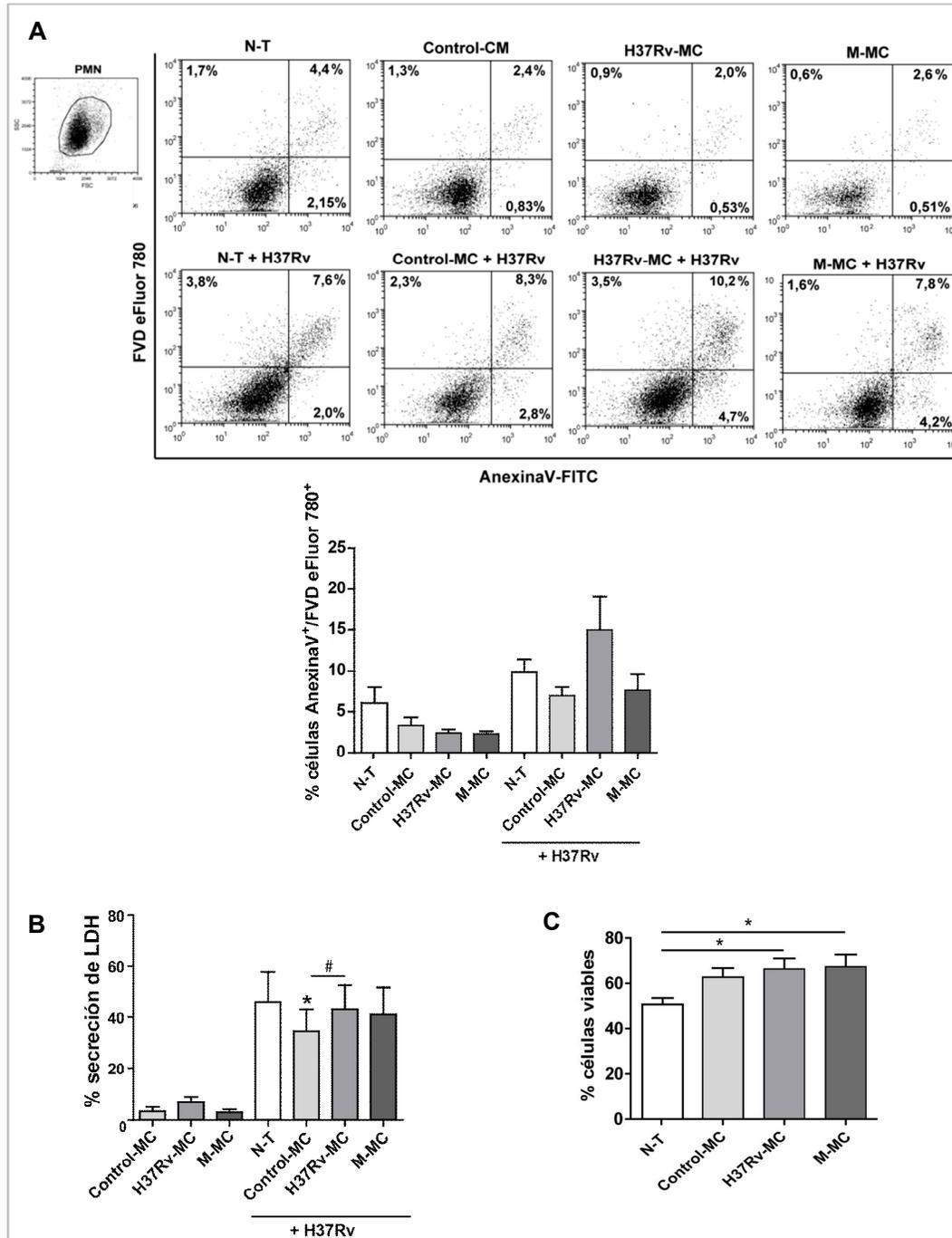
### Efecto de los medios condicionados sobre la muerte de PMN infectados con H37Rv

Se ha reportado que los PMN mueren rápidamente luego de la infección por H37Rv [148] y que determinadas citoquinas como GM-CSF e IL-8 actúan sobre los PMN incrementando la sobrevivencia de dichas células al momento de la infección [149]. Nos preguntamos entonces si las células del epitelio bronquial podrían contribuir a la acumulación de los PMN en el tracto respiratorio en el contexto de la infección por *Mtb* a través de la producción de ciertos factores solubles que incrementarían la sobrevivencia de los mismos. Para este propósito, los PMN fueron estimulados o no con los distintos medios condicionados (MC) posteriormente infectados con H37Rv a una MOI de 3 y finalmente cultivados por 18 h más. Como se muestra en la Figura 23A, los PMN infectados muestran un mayor porcentaje de células en apoptosis tardía en

comparación con los no infectados, mientras que no se observaron diferencias respecto a células en estado necrótico o en apoptosis temprana.

El pre-tratamiento de los PMN con Control-MC y el M-MC redujo el porcentaje de células en apoptosis tardía en comparación con las células no tratadas, mientras que el H37Rv-MC no lo hizo. En el mismo contexto, los PMN infectados demostraron un mayor porcentaje de secreción de LDH que los no infectados y su pre-tratamiento con Control-MC disminuyó los niveles de LDH liberados mientras que el H37Rv-MC y el M-MC no lo hicieron (Figura 23B). Este hecho podría estar parcialmente ligado a las cantidades de GM-CSF encontradas en los distintos MC.

En paralelo, se estimularon los PMN con i-H37Rv y luego se trataron con el MC derivado de Calu-6 infectadas con las cepas H37Rv o M (H37Rv-MC o M-MC) o no (Control-MC) evaluándose luego el porcentaje de células viables por microscopía de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 23C, los PMN estimulados con los MC, fueron capaces de rescatar a los PMN de la muerte inducida por i-H37Rv, lo cual podría deberse al contenido de GM-CSF e IL-8 presentes en los MC. Si bien, los ensayos son diferentes en lo que respecta al tiempo en que se tratan los PMN con los MC y al hecho del empleo de i-H37Rv, estos resultados coinciden con los ensayos de liberación de LDH por PMN infectados con células viables.



**Figura 23 | Impacto de los MC sobre la muerte, permeabilidad celular en PMN. A.** PMN tratados o no ( $n=5$ ) con los MC e infectados con H37Rv (MOI=3) fueron testeados para la expresión de Annexina V y FVD eFluor 780 por citometría de flujo. El porcentaje de PMN en apoptosis temprana (Annexina V pos/FVD eFluor 780 neg), apoptosis tardía (Annexina V pos/FVD eFluor 780 pos) y necrosis (Annexina V neg/FVD eFluor 780 pos) fue determinado. Se muestran los gráficos *Dot Plots* de un experimento representativo de 5 totales y el gráfico de barras mostrando la cuantificación de células en apoptosis tardía (media  $\pm$  error estándar). **B.** Los sobrenadantes derivados de los PMN infectados con H37Rv fueron recuperados 18h

post infección y testeados para secreción de LDH expresada como porcentaje (medias  $\pm$  error estándar). Diferencias estadísticas: \* =  $p < 0.05$  para Control-MC vs. PMN N-T; # =  $p < 0.05$  PMN tratados con H37Rv-MC vs. Control-MC (n=7). **C. Los MC inducen un aumento en la sobrevida de los PMN.** PMN (n=5) fueron estimulados con i-H37Rv por 3 h y luego tratados con o no (N-T) con Control-MC, H37Rv-MC o M-MC por 18 h. Luego fueron cosechados y se les adicionó un cocktail de tinción con bromuro de etidio (100 ug/ml) y naranja de acridina (100 ug/ml). Se examinaron los PMN al microscopio de fluorescencia 40X. Las células se identificaron como: viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías o necróticas de acuerdo al estado y coloración del núcleo como se describió en materiales y métodos. Se muestran las medias  $\pm$  el error estándar. Diferencias estadísticas: \* =  $p < 0.05$  para PMN N-T vs. H37Rv-MC o M-MC.

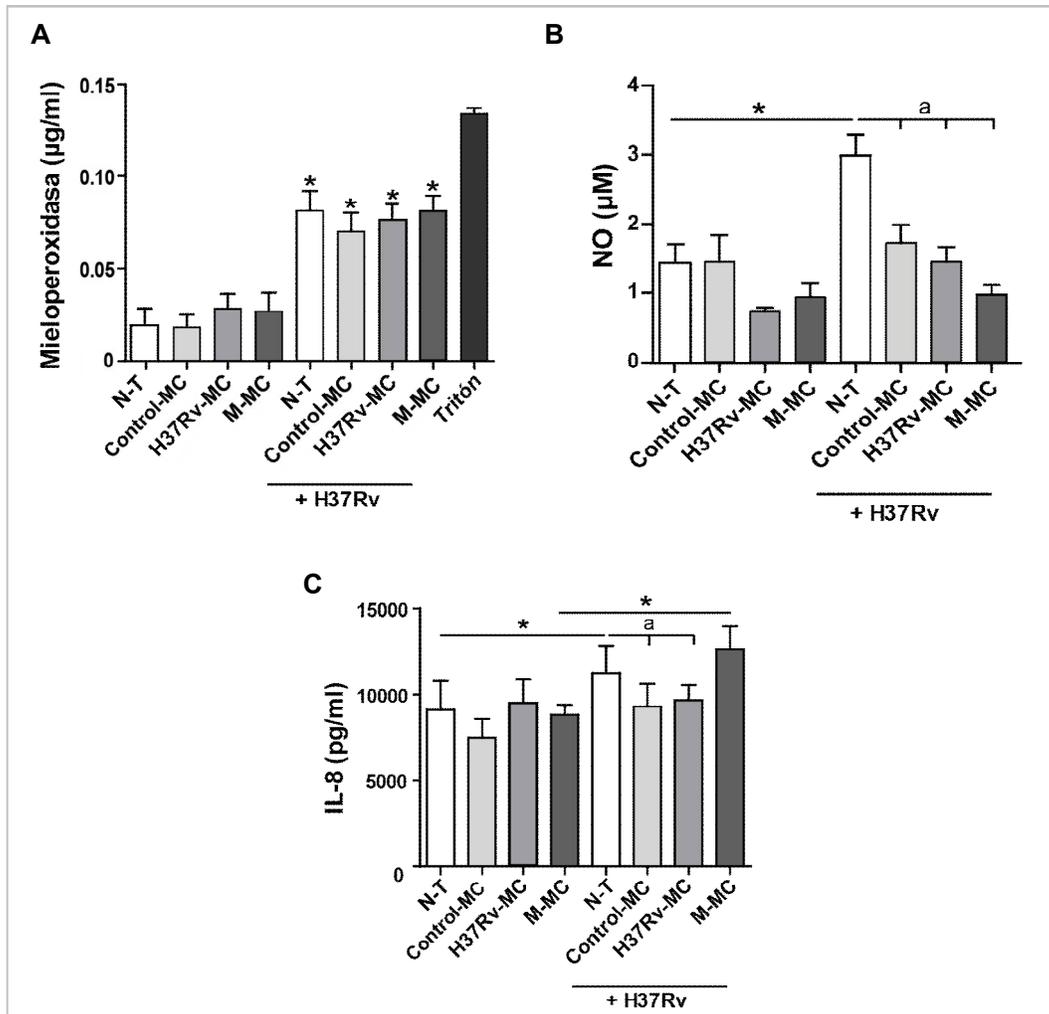
### **Impacto de los medios condicionados sobre la producción de NO, MPO y secreción de IL-8 luego de la infección por *Mtb***

Aunque existe evidencia que sugiere que los PMN son capaces de inducir la síntesis de óxido nítrico (NO) sintetasa durante la sepsis, hay muy poca evidencia que involucre el rol del NO en la muerte de microorganismos [94]. Dado que los intermediarios del nitrógeno tienen un efecto bacteriostático sobre *Mtb* en un sistema libre de células [150], nos preguntamos si los medios condicionados (MC) podían alterar la capacidad de los PMN para producir NO. Observamos que la infección con H37Rv induce un aumento en la producción de NO en los PMN no expuestos a los MC, mientras que el pre-acondicionamiento de las células con los MC disminuye su producción luego de la infección (Figura 24A), sugiriendo que en el compartimento bronquial, las especies reactivas del nitrógeno no estarían jugando un rol esencial en lo que respecta a la eliminación del patógeno. Sin embargo, los bajos niveles de NO producidos por los PMN cuando son tratados con los MC luego de la infección con H37Rv, podría sugerir que dichas células estarían siendo más permisivas a la replicación intracelular del *Mtb*, retrasando la muerte del patógeno mediante la inhibición de la generación de NO.

Por otro lado, los PMN almacenan en sus gránulos distintas proteínas y enzimas hidrolíticas tales como: péptidos catiónicos, proteasas, lactoferrina y

mieloperoxidasa (MPO). Una vez activado el PMN, los gránulos se fusionan con el fagosoma contribuyendo a la actividad microbicida de estos compartimentos, o con la membrana plasmática, liberando su contenido al espacio extracelular, acción que crea un ambiente antimicrobiano inhóspito para el patógeno [98]. En este contexto, nos propusimos determinar si los MC eran capaces de inducir la liberación de MPO en los PMN o alterar su secreción ante la infección con H37Rv. Como se puede ver en la Figura 24B, los MC no son capaces de promover la liberación de MPO y no alteraron el aumento de los niveles de MPO inducidos por la infección con H37Rv, sugiriendo que es la propia infección con el patógeno la que genera la secreción de MPO al medio extracelular y que las citoquinas contenidas en los MC no tienen influencia sobre dicha acción.

Se ha reportado que la secreción de IL-8 por los PMN ocurre tanto luego de su estimulación como de manera constitutiva y que son capaces de secretar niveles significativos de dicho factor soluble. Es importante mencionar que la IL-8 tiene importantes efectos autocrinos: es un potente quimioattractante para los propios PMN así como también es capaz de activar diferentes funciones efectoras tales como maduración y reclutamiento desde la médula ósea, mecanismos de *rolling* y diapédesis desde los vasos sanguíneos hacia los sitios de infección, estrés oxidativo, exocitosis y fagocitosis [151]. En función de esto evaluamos si los MC modulaban la secreción de IL-8 en los PMN infectados o no con H37Rv luego de 18 h de cultivo. Como se puede ver en la Figura 24C, no hay diferencias en los niveles de IL-8 entre los PMN pre-incubados con los MC y los no tratados. Un incremento en la liberación de IL-8 fue detectado en los PMN N-T luego de la infección con H37Rv cuando se comparó con aquellos no infectados. Mientras que los PMN expuestos a M-MC generaron cantidades similares de IL-8 en comparación con los N-T, la pre-incubación con el Control-MC o H37Rv-MC mostró una menor secreción de IL-8 luego de la infección con H37Rv.



**Figura 24 | Producción de NO, MPO y secreción de IL-8 en PMN.** Los sobrenadantes derivados de los PMN infectados o no con H37Rv y estimulados con los MC fueron recuperados 18h post-infección y testeados para **A.** producción de mieloperoxidasa (MPO), expresado como µg/ml (medias ± error estándar), (n=6), **B.** especies reactivas del Nitrógeno (NO), expresado como µM (medias ± error estándar), (n=5) y **C.** secreción de IL-8 expresada como pg/ml (medias ± error estándar), (n=7). Diferencias estadísticas: \*= $p < 0.05$  para PMN infectados con H37Rv vs. No infectados; a= $p < 0.05$  para PMN tratados con los MC vs. PMN N-T.

# **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

## DISCUSIÓN

En los últimos años se ha demostrado que, contrariamente a lo que se creía, *Mtb* no es una especie muy conservada ya que por técnicas de biología molecular se demostró una amplia variabilidad genética en su distribución mundial, lo que sugiere la existencia de adaptaciones a poblaciones humanas particulares [12]. En este contexto, en trabajos previos de nuestro laboratorio hemos observado que, al contrario de la cepa de referencia, H37Rv, la cepa M, aislada del primer brote multirresistente a drogas en nuestro país, tiene un crecimiento lento en macrófagos humanos y es pobre inductora de la secreción de TNF- $\alpha$ , citoquina pro-inflamatoria que sostiene la formación del granuloma, así como también de la expresión de IFN- $\gamma$ , citoquina que promueve la activación de los mecanismos microbicidas del macrófago y de la diferenciación de linfocitos T citotóxicos, células capaces de matar macrófagos infectados con la micobacteria.

Numerosos estudios demuestran la capacidad de *Mtb* de alterar la respuesta inmune adaptativa e innata del hospedero, sin embargo, pocos estudios se han focalizado en el papel del epitelio bronquial en la infección por micobacterias. Considerando el rol crítico de las células del epitelio bronquial humano en el mantenimiento de la estructura normal y funcional de las vías aéreas, es de esperar que una desregulación en el epitelio bronquial pudiera contribuir a la patogénesis de muchas enfermedades pulmonares [73], entre ellas la tuberculosis. Sin embargo, debido a que el *Mtb* ha desarrollado múltiples estrategias para manipular la respuesta inmune del huésped, la micobacteria es capaz de superar estas barreras y acceder hacia las profundidades del pulmón [76].

Evidencias *in vivo* e *in vitro* sugieren que las células del epitelio bronquial humano son capaces de interactuar con *Mtb* antes de su llegada al espacio alveolar [80], [152]. Por lo tanto, las células bronquiales podrían ser capaces de contribuir a la eliminación inicial del patógeno e influenciar la respuesta inmune temprana por medio

de la liberación de péptidos antimicrobianos, secreción de citoquinas y quimioquinas, las cuales sostendrían la afluencia de células del sistema inmune innato y adaptativo al sitio de infección y su consecuente activación [57].

En este trabajo de tesis, nos hemos focalizado en la interacción de dos genotipos de *Mtb* con el epitelio bronquial humano y las posibles alteraciones que dicha interacción pudiera ejercer sobre las primeras células de la respuesta inmune innata en arribar al foco inflamatorio, los neutrófilos (PMN). Nuestros resultados demuestran que la cepa M de *Mtb* multirresistente a drogas es capaz de infectar y sobrevivir dentro de las células del epitelio bronquial humano de la línea celular Calu-6, a pesar de tener una menor capacidad de adherencia y replicación intracelular que la cepa de referencia H37Rv. Asimismo, el medio condicionado derivado de Calu-6 infectadas con la cepa M mostró tener una débil capacidad quimioattractante de PMN debido, en parte, a los bajos niveles de IL-8 detectados, lo cual podría disminuir el reclutamiento de dichas células hacia el compartimento pulmonar infectado. Además, la cepa M indujo una inhibición de la secreción de TNF- $\alpha$  por Calu-6 lo cual podría alterar indirectamente la activación de los PMN.

Se ha establecido que las células del epitelio bronquial son menos permisivas para ser invadidas por *Mtb* en comparación con las del epitelio alveolar [152]. De acuerdo a la literatura, observamos que las células Calu-6 son menos proclives a ser invadidas por *Mtb* teniendo en cuenta que el 21% de la cepa H37Rv y el 8% de la cepa M fueron internalizadas por dichas células y, adicionalmente, se denota la importancia del genotipo micobacteriano en lo que respecta a la invasión en el epitelio bronquial. Se ha propuesto que la interacción con el epitelio pulmonar depende en gran medida de la virulencia del genotipo de *Mtb*. Así, el aislado F15/LAM4/KZN proveniente de KwaZulu-Natal (Sudáfrica) y la cepa Beijing (China), que se caracterizan por tener una alta tasa de diseminación en sus comunidades, muestran una gran capacidad de adhesión e invasión a células del epitelio alveolar y bronquial humano en comparación con aquellas cepas que muestran un *fingerprinting* único o la cepa de referencia

H37Rv [153]. En oposición con dichos resultados, nosotros observamos que la cepa M, altamente exitosa en lo que respecta a su diseminación en nuestra comunidad [30], presentó una baja capacidad replicativa dentro de Calu-6, sugiriendo que esta cepa podría haber desarrollado mecanismos de evasión diferentes a los de las cepas de alta replicación para sobrevivir en este nicho celular no convencional. Por otro lado, se observó un ligero desprendimiento de las monocapas de Calu-6 infectadas con la cepa H37Rv o con la M en forma indistinta; este desprendimiento no se atribuiría a muerte celular al menos en términos de secreción de lactato deshidrogenasa mitocondrial como se ha demostrado previamente [154] o tinción con Anexina V/Fluor780; sin embargo, no podemos excluir la contribución de efectos citopáticos sobre las monocapas celulares debido, por ejemplo, a alteraciones en la integridad de las uniones estrechas entre células [155].

Las células epiteliales de las vías respiratorias son una fuente importante de factores solubles implicados en la respuesta del hospedero frente a la infección por micobacterias. Se ha demostrado que el reclutamiento de PMN por células de la línea celular del epitelio alveolar humano A549, infectadas con cepas de laboratorio y aislados clínicos de *Mtb* [156] y *M. bovis* BCG [157], está dado en mayor medida por la secreción de IL-8, quimioquina de particular relevancia debido a su capacidad para reclutar selectivamente poblaciones celulares inmunocompetentes hacia el sitio de infección y así regular el tráfico de leucocitos [158]. En este trabajo de tesis, mostramos que la cepa M indujo una baja secreción de IL-8 por las células del epitelio bronquial y, como consecuencia, el medio condicionado derivado de dichas células no fue capaz de atraer PMN eficientemente. Por otro lado, las células del compartimento pulmonar son capaces de producir metaloproteinasas, enzimas proteolíticas que, colectivamente, son capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular y generar de esta manera daño tisular [142]. Como consecuencia, las metaloproteinasas tienen un gran potencial para favorecer el flujo de PMN al sitio de inflamación, sugiriendo que el daño tisular inducido por las mismas podría de hecho facilitar la

migración de los PMN [159] así como también de macrófagos. De hecho estudios como los de Ramakrishnan y col. [160] han demostrado que la metaloproteinasa-9 (MMP-9) incrementa el reclutamiento de macrófagos, los cuales contribuyen a la maduración del granuloma naciente y al crecimiento bacteriano ya que la disrupción de la función de MMP-9 alteró dichas funciones. Elkington y col. [142] han comunicado que las células primarias bronquiales humanas y de la línea de epitelio bronquial 16HBE14 secretan MMP-9 solo en respuesta a medios condicionados de macrófagos infectados con H37Rv y no por infección directa con la micobacteria. En oposición a este trabajo, en nuestro sistema de estudio, observamos que las células Calu-6 fueron capaces de secretar MMP-2 y MMP-9 luego de la infección directa con H37Rv. Sin embargo, la cepa M indujo una menor actividad MMP-9 en Calu-6 que la cepa H37Rv e inhibió la actividad MMP-2, hecho que podría contribuir a un menor flujo de PMN al compartimiento bronquial durante las etapas tempranas de infección.

Asimismo, las células del epitelio pulmonar son capaces de producir citoquinas necesarias para desarrollar una adecuada respuesta inmune en el compartimento pulmonar. En este contexto, hemos observado que las células Calu-6 liberan constitutivamente altos niveles de TGF- $\beta$ , hecho que concuerda con la literatura [161], y su secreción no se incrementó luego de la infección con las cepas de *Mtb*. Los altos niveles de esta citoquina fueron esperables ya que TGF- $\beta$  es un potente mediador anti-inflamatorio y su presencia sería necesaria para evitar una respuesta inmune exacerbada en el espacio aéreo, moderando la inflamación tisular y participando como regulador central en la reparación de tejidos [162]. A pesar de este escenario anti-inflamatorio, la secreción de TNF- $\alpha$  por Calu-6 sí se vio incrementada tras la infección con H37Rv, hecho que fue dependiente de la carga bacilar. De hecho, la cepa M, que ciertamente tiene una menor capacidad infectiva en comparación con la H37Rv, logró generar un aumento en la liberación de TNF- $\alpha$  recién a una MOI de 50 igualando así los niveles de TNF- $\alpha$  secretados por la cepa H37Rv a una MOI de 5; lo mismo se pudo

observar con la quimioquina IL-8, pero no así con GM-CSF donde parecería que la cepa M estaría inhibiendo su secreción independientemente de la carga bacilar.

Considerando que los PMN se activan rápidamente en respuesta a estímulos como factores quimiotácticos, citoquinas e incluso complejos inmunes [163], y teniendo en cuenta que TNF- $\alpha$  está involucrado en la activación de los PMN y en la pre-activación de respuestas frente a un segundo estímulo [164], especulamos que la infección de las células del epitelio bronquial con *Mtb* podría modular las respuestas efectoras de los PMN. De hecho, nuestros resultados muestran que los MC derivados de Calu-6 infectadas o no con *Mtb* no modificaron la expresión basal de CD11b, un marcador de activación/degranulación [144] en PMN. Sin embargo, se observó que los distintos MC modulaban en forma diferencial el aumento de la expresión de CD11b de los PMN expuestos a un segundo estímulo antigénico. Así, mientras que H37Rv-MC indujo un aumento en la expresión de CD11b, M-MC no lo hizo, y esto fue dependiente del contenido de TNF- $\alpha$  en los MC. Dado que CD11b es traslocado hacia la superficie de la membrana celular durante la exocitosis de los gránulos como consecuencia de la activación de los PMN [144], nuestros resultados sugieren que los mediadores solubles derivados de células del epitelio bronquial infectados con *Mtb* podrían potenciar la activación de los PMN frente a un segundo estímulo a través de la liberación diferencial de TNF- $\alpha$ . Por otro lado, se ha reportado que TNF- $\alpha$  y GM-CSF no inducen directamente estallido respiratorio en PMN pero sí se observa un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) gatillada por fMLP [165]. En concordancia con esto, ninguno de los MC empleados activó directamente el estallido respiratorio en PMN, pero sí regularon la producción diferencial de EROs en respuesta a un segundo estímulo. Nuestros resultados demuestran que cuanto más alto es el nivel de TNF- $\alpha$  presente en el MC utilizado como pre-activador de los PMN, más fuerte será la producción de EROs por los PMN en respuesta a PMA o i-H37Rv. Además, los ensayos llevados a cabo con los MC depletados de o suplementados con

TNF- $\alpha$  confirman el impacto de la liberación de TNF- $\alpha$  por las células del epitelio bronquial sobre la producción de EROs en PMN.

Diversos estudios han revelado la importancia de la cascada de p38 MAPK en la activación de los PMN donde p38 MAPK es fosforilada rápidamente en respuesta a ciertos estímulos como TNF- $\alpha$  o GM-CSF, factores quimioattractantes tales como fMLP o IL-8 e incluso PMA, sugiriendo que esta cascada intracelular de quinasas podría jugar un papel clave en la regulación de las funciones efectoras de los PMN como la producción de EROs [127]. En concordancia con estas observaciones, el aumento de la expresión de la forma fosforilada de p38 MAPK en PMN incubados con los sobrenadantes de Calu-6 control o infectadas con *Mtb* dependió de los niveles de TNF- $\alpha$  presentes en los medios condicionados. Así, la baja secreción de TNF- $\alpha$  por el epitelio bronquial infectado por la cepa M podría afectar negativamente la señalización intracelular que involucra la fosforilación de p38 MAPK, alterando finalmente la respuesta funcional de los PMN frente a un segundo estímulo antigénico. Por otro lado, estudios previos han demostrado que la inhibición de la p38 MAPK afecta negativamente la quimiotaxis de PMN [128]. Teniendo en cuenta estos precedentes y de acuerdo a nuestros resultados que indican que el M-MC tiene menor capacidad quimioattractante de PMN, podríamos especular que la p38 MAPK tendría un potencial rol en el suministro de orientación direccional de las células y movilización de PMN al sitio de infección. Estas observaciones en conjunto, sugieren que la vía de la p38 MAPK tiene un papel central en la regulación tanto de la quimiotaxis como de la producción de EROs en los PMN estimulados con los medios condicionados (MC).

Otro de los mecanismos mediante el cual los PMN son capaces de montar una estrategia para inmovilizar y matar al microorganismo invasor está mediado por las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) [99]. Aunque poca atención se le ha prestado al rol de las NETs en el contexto de la infección por micobacterias dada la naturaleza intracelular del patógeno, recientemente se ha demostrado la presencia de NETs en plasma de pacientes con TB como consecuencia de la infección por *Mtb*

[166]. Se ha demostrado que los PMN estimulados *in vitro* con *Mtb* liberan NETs que efectivamente atrapan a la micobacteria en el espacio extracelular pero no matan a la micobacteria, a pesar de contener una alta concentración de proteínas microbicidas tales como elastasa e histonas, razón por la cual se ha sugerido que las NETs podrían mantener a la infección localizada en el pulmón impidiendo su dispersión a otros órganos. Además se ha propuesto que estas trampas extracelulares podrían secuestrar citoquinas y quimioquinas que se encuentran en el microambiente bronquial, llevando al reclutamiento de más células fagocíticas al sitio de infección y así establecer las bases para la formación del granuloma [167]. En nuestro sistema, observamos que en oposición al H37Rv-MC, el M-MC no indujo la formación de NETs, lo que nos permitiría especular que la cepa M podría alterar indirectamente la formación de estas barreras extracelulares de contención y la formación temprana del granuloma.

Aunque aún es materia de discusión si los PMN son capaces de eliminar los bacilos de *Mtb* intra o extracelulares, sin duda está establecido que estas células interaccionan e internalizan la micobacteria [148], [168], siendo el tipo celular predominante infectado con *Mtb* en muestras de pulmón de pacientes con TB [169]. El hecho de que se haya observado mayor carga bacilar intracelular en PMN que en macrófagos provenientes de esputo sugiere que estas células fallan en restringir el crecimiento intracelular siendo un nicho permisivo para la replicación del *Mtb* [169]. La correlación entre la presencia de PMN y carga bacilar observada en granulomas de macacos infectados con *Mtb* [170] apoyaría este concepto. Si los PMN pueden eliminar la micobacteria *in vivo* dependerá probablemente del microambiente tisular, estadio de la infección, hospedero y organismo infectante [87]. Nuestros resultados demuestran que los PMN internalizan los bacilos de H37Rv a pesar de su preincubación con los medios condicionados, sugiriendo que el microambiente bronquial no altera la capacidad de los PMN para reconocer y fagocitar el *Mtb*. Sin embargo, mientras el tratamiento de PMN con Control-MC y el H37Rv-MC no modificó la

replicación intracelular de H37Rv, M-MC aumentó su replicación, hecho que podría ser parcialmente atribuido, a pesar de su discutido papel como microbicida [148], a la baja capacidad de los PMN para producir EROs intracelular. Dado que Kisich y col. [112] han demostrado que la eliminación del *Mtb* por los PMN depende de la activación de las células con TNF- $\alpha$ , permite suponer que el incremento en la replicación de H37Rv en PMN estimulados con M-MC podría ser consecuencia de los bajos niveles de TNF- $\alpha$  detectados en dicho MC. Por otro lado, teniendo en cuenta que los intermediarios reactivos del nitrógeno tienen efecto bacteriostático sobre *Mtb in vitro* [150], podríamos especular que la baja producción de óxido nítrico (NO) detectada en PMN expuestos a los MC y en especial con M-MC podría sostener la replicación bacteriana de H37Rv. Es más, el aumento de la replicación en PMN expuestos a M-MC podría ser consecuencia de la baja producción de NO en conjunción con la baja producción de EROs en respuesta a la infección. Sin embargo, no podemos descartar que otros mecanismos tales como la fusión de gránulos que contienen factores antimicrobianos con el fagosoma puedan resultar alterados en los PMN infectados con H37Rv y previamente expuestos a M-MC. La pobre capacidad de los PMN para eliminar el *Mtb* le ha permitido a muchos autores considerarlos como “caballos de Troya” que esconden al *Mtb* de potenciales macrófagos bactericidas [87]. La pregunta sobre por qué estas células con un excepcional poder microbicida no son absolutos bactericidas contra la micobacteria aún no tiene respuesta.

En este trabajo de tesis, observamos que la infección de los PMN con H37Rv indujo la muerte de los mismos a juzgar por la secreción de lactato deshidrogenasa, hecho que concuerda con la literatura existente [148]. Si bien el pre-tratamiento de los PMN con los medios condicionados no indujo muerte celular de los mismos, los medios condicionados sí modificaron en forma diferencial la muerte provocada por H37Rv. Solamente el pre-tratamiento de los PMN con el Control-MC retrasó la muerte de los PMN, hecho que podría deberse a su mayor contenido de GM-CSF. En este sentido, se ha demostrado que las células primarias del epitelio bronquial en

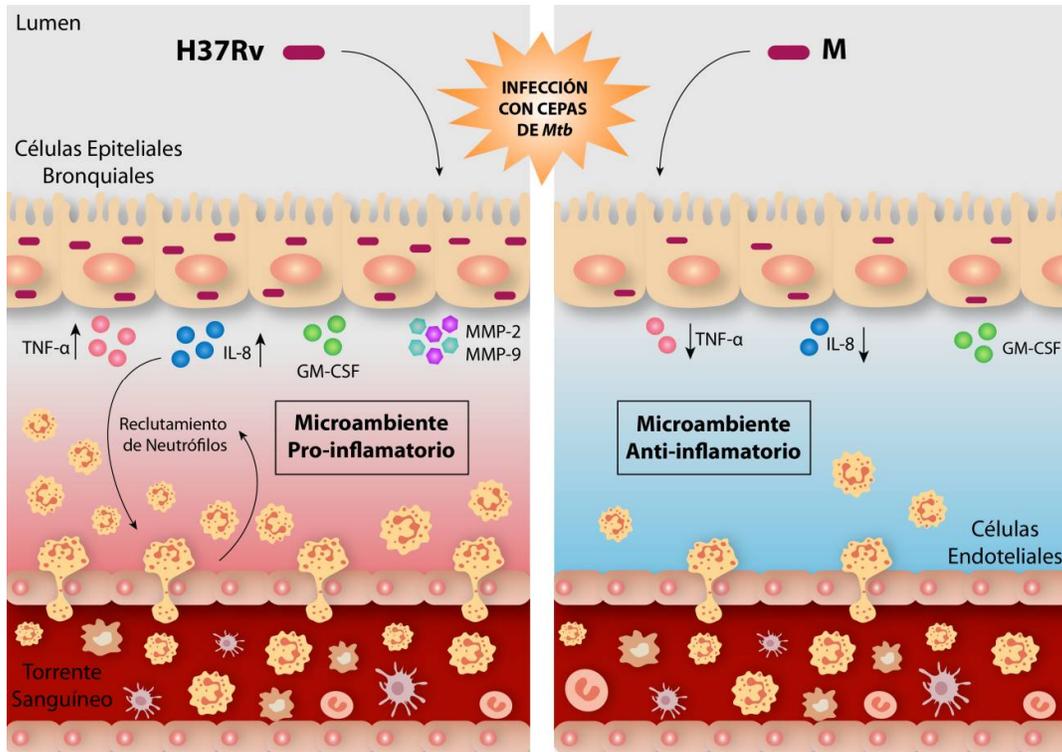
condiciones normales aumentan la sobrevivencia *in vitro* de los PMN [149] a través de la secreción de dicha citoquina.

Finalmente, y en línea con otros estudios [171], la infección de los PMN con H37Rv aumentó los niveles de IL-8 secretados, quimioquina que tiene un papel fundamental en el reclutamiento de leucocitos hacia áreas de formación del granuloma así como también en el estallido respiratorio. Interesantemente, los PMN preincubados con M-MC liberaron niveles mayores de IL-8 en comparación con los no infectados. De esta manera, se podría especular que si bien las células bronquiales infectadas por la cepa M tendrían menor capacidad para atraer PMN, una vez que los mismos llegan al compartimento bronquial producen mayores niveles de IL-8 en respuesta a la infección por *Mtb* permitiendo un mayor reclutamiento de PMN y de otras células inmunocompetentes al sitio de infección. En relación con lo mencionado anteriormente, observamos un incremento en la mieloperoxidasa (MPO) extracelular liberada debido a procesos de degranulación de los PMN luego de la infección con *Mtb*, y dicha enzima sería capaz de estimular macrófagos residentes y otras células reclutadas, resultando en la *up*-regulación de genes de factores solubles como TNF- $\alpha$  y dando lugar a un estado inflamatorio y citotóxico de las células que contribuirá a la respuesta inflamatoria pulmonar [172]. Además, los productos derivados de la actividad enzimática son moléculas altamente oxidativas y la fuga de la MPO de las células fagocíticas podría contribuir al daño en los tejidos adyacentes y a empeorar aún más la lesión [173] dado que el daño es indiscriminado y no existe distinción alguna entre la bacteria y las células hospedadoras [174], lo cual contribuiría a la inmunopatología de la tuberculosis.

## CONCLUSIONES

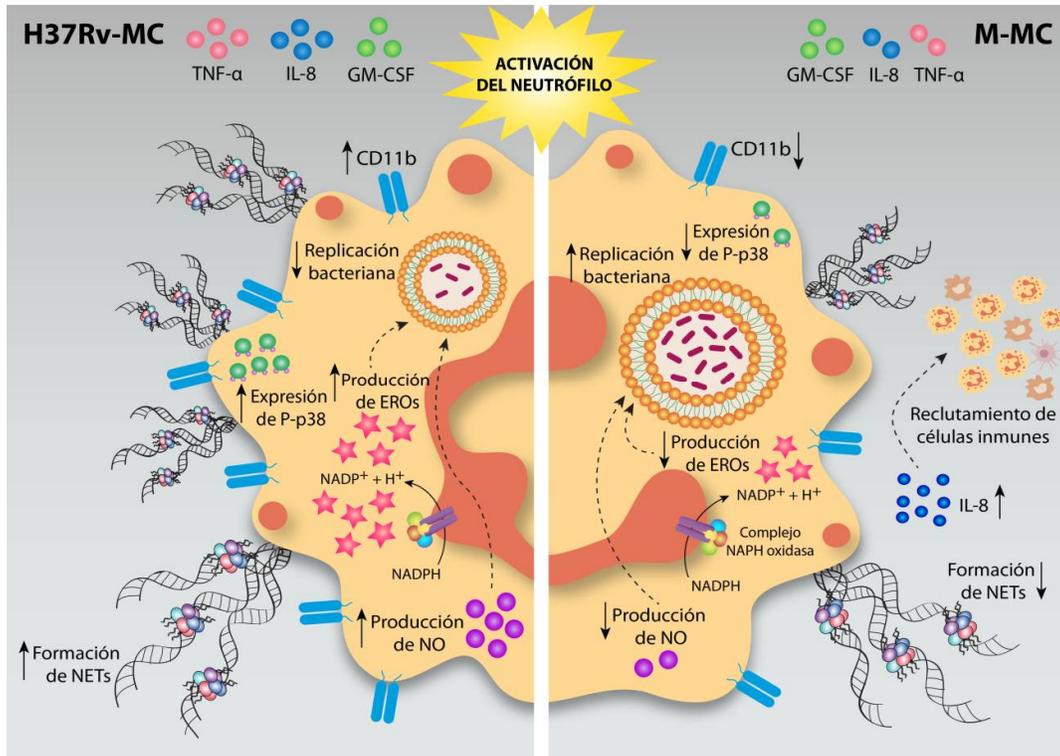
En síntesis, aunque la cepa M de *Mtb* mutirresistente a drogas tiene una baja tasa de infección, es capaz de sobrevivir dentro de células del epitelio bronquial humano. Además, tanto la cepa M como la H37Rv inducen y/o modulan

diferencialmente la secreción de distintas citoquinas, quimioquinas y metaloproteinasas por el epitelio infectado lo cual impacta directamente sobre el microambiente del compartimiento bronquial, tal como se ha graficado en la Figura 25.



**Figura 25 | Efecto directo de las cepas H37Rv y M sobre el epitelio bronquial humano.** La cepa H37Rv y M difieren en su capacidad de infección pero ambas son capaces de infectar el epitelio bronquial humano y sobrevivir dentro de dichas células. A su vez, el epitelio infectado por H37Rv secreta citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α y GM-CSF, la quimioquina IL-8 y metaloproteinas (MMP-9 y MMP-2) que, en conjunto, contribuyen a la generación de un microambiente pro-inflamatorio. Por el contrario, la cepa M induce un ambiente anti-inflamatorio debido a una menor secreción de dichos factores solubles luego de la infección. Además, la menor secreción de IL-8 conduce a una falla en la capacidad quimiotáctica de PMN desde el torrente sanguíneo hacia el epitelio infectado por M.

En contraposición con H37Rv, la cepa M es baja inductora de secreción de IL-8 por parte del epitelio bronquial, minimizando así la quimiotaxis de los PMN hacia el sitio de infección. Según lo observado en esta tesis, una vez que los PMN arriban al compartimiento bronquial, se encuentran con distintos microambientes según la cepa infectante, hecho que impacta sobre la activación y funcionalidad de los PMN, tal como se ha resumido en la Figura 26.



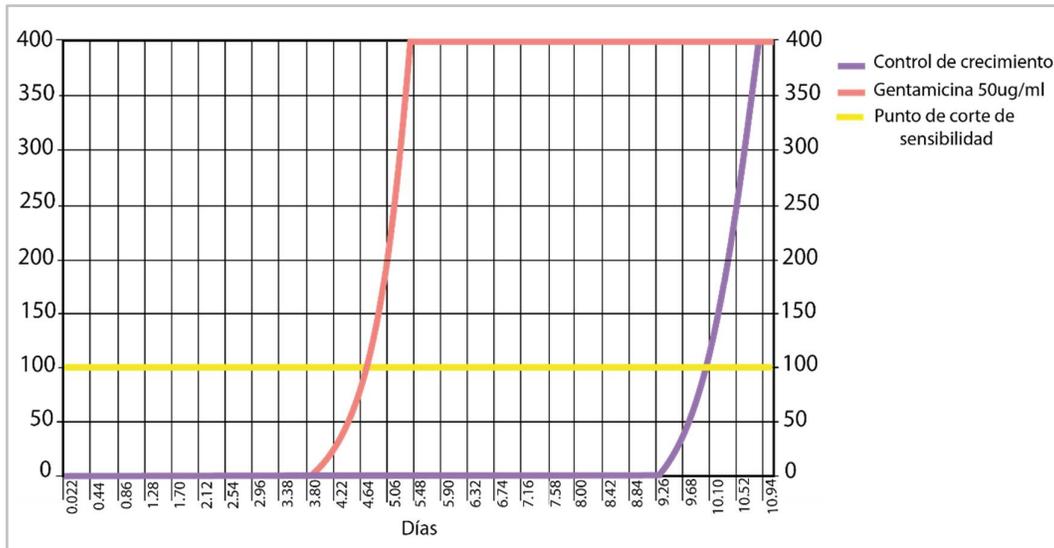
**Figura 26 | Efecto indirecto en la interacción entre el epitelio bronquial y los PMN y su consecuente activación.** El contenido diferencial de factores solubles (IL-8, TNF- $\alpha$  y GM-CSF) presentes en los medios condicionados (MC) derivados de células epiteliales bronquiales infectadas con H37Rv (H37RV-MC) y M (M-CM) repercute en la activación en términos de la expresión de CD11b y P-p38 MAPK y parámetros funcionales de los PMN tales como formación de NETs y producción de EROs y NO. La pobre producción de EROs y NO por PMN pre-incubados con M-CM contribuye a aumentar la permisividad de la replicación de H37Rv. Además, al contrario de H37Rv-CM, M-CM promueve la secreción de IL-8 por los PMN infectados.

A diferencia de la cepa H37Rv, la cepa M inhibe la liberación de TNF- $\alpha$  por el epitelio infectado, lo cual repercute negativamente sobre ciertos parámetros de activación del PMN como la expresión de CD11b y la fosforilación de la p38 MAPK y

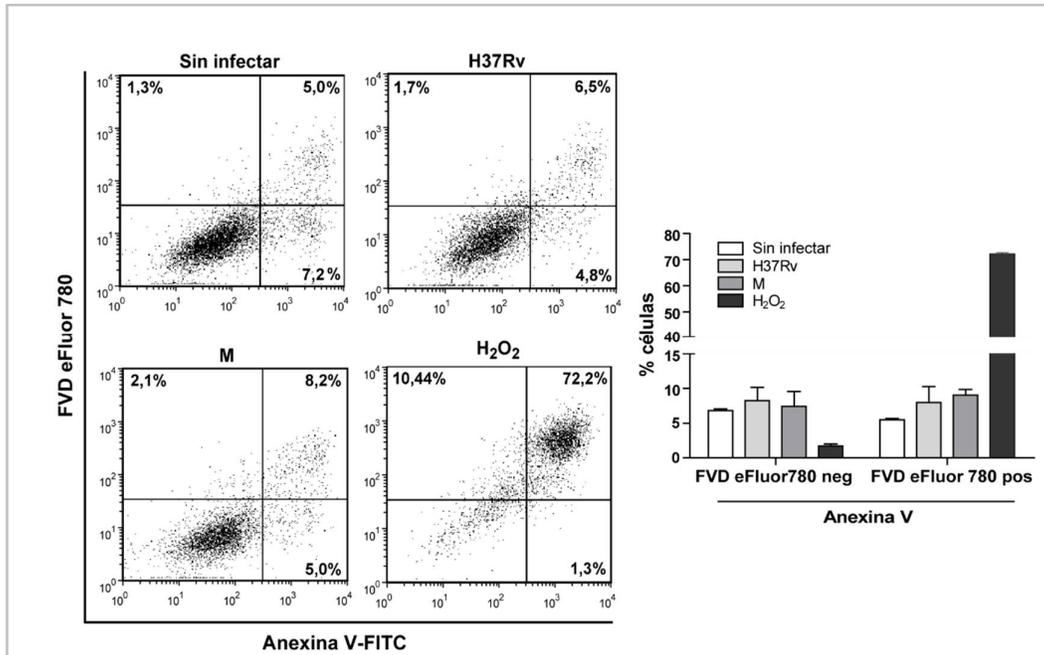
sobre mecanismos efectores microbicidas/bacteriostáticos tales como la generación de NETs y la producción de EROs y NO. Como consecuencia, el MC derivado de células bronquiales infectadas con la cepa M provoca un aumento en la replicación intracelular de la micobacteria en PMN, hecho que posibilitaría la liberación de un alto número de micobacterias al compartimento pulmonar luego de la muerte de los PMN infectados con *Mtb*. Por otro lado, el hecho de que el microambiente del epitelio bronquial infectado con la cepa M induzca la liberación de IL-8 por parte de los PMN infectados con *Mtb*, resultaría en un reclutamiento sostenido de PMN así como de otras células inmunocompetentes al sitio de infección y revertir la poca actividad quimioattractante del epitelio infectado (Figura 26). Dado que los PMN ejercen un rol dual durante la infección con *Mtb*, esto podría resultar en un arma de doble filo para el hospedero, contribuyendo por un lado a la formación del granuloma, y por otro lado, estando directamente involucrados tanto en la necrosis y destrucción de tejidos como en la diseminación de la infección.

# ANEXO

## FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura Suplementaria 1 | La cepa M es resistente al antibiótico Gentamicina.** La técnica utilizada fue de cultivo automatizado en el sistema MGIT-BACTEC 960. Se sembró un tubo control y uno con gentamicina 50ug/ml. Las curvas violeta y naranja representan el crecimiento de la cepa M en ambas condiciones respectivamente (eje y: unidades de crecimiento, UC). El crecimiento se considera positivo cuando supera el punto de corte de sensibilidad (amarillo). Se corroboró la pureza de ambos cultivos por tinción de Ziehl-Neelsen al finalizar la prueba. El resultado indica que en estas condiciones.



**Figura suplementaria 2 | Las cepas de *Mtb* no inducen muerte en Calu-6.** Monocapas de Calu-6 fueron infectadas con las cepas H37Rv o M a una MOI de 50 por 2h y se permitió la replicación intracelular por 18h más para determinar la muerte celular midiendo expresión de Anexina V y FVD eFluor 780 por citometría de flujo. Los resultados son expresados como porcentaje de células apoptóticas tempranas (Anexina V pos/FVD eFluor 780 neg), apoptóticas tardías (Anexina V pos/FVD eFluor 780 pos) o células necróticas (Anexina V neg/ FVD eFluor 780 pos). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue usada como control positivo. Dot Plots representativos demostrando la estrategia de selección de células Calu-6 y gráfico de barras con la cuantificación y media  $\pm$  el error estándar se muestran (n=5).

# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Fogel, "Tuberculosis: A disease without boundaries," *Tuberculosis*, vol. 95, no. 5. pp. 527–531, 2015.
- [2] W. Cruz-Knight and L. Blake-Gumbs, "Tuberculosis: an overview.," *Prim. Care*, vol. 40, no. 3, pp. 743–56, Sep. 2013.
- [3] I. Comas and S. Gagneux, "The past and future of tuberculosis research," *PLoS Pathogens*, vol. 5, no. 10. 2009.
- [4] World Health Organization, "Tuberculosis Fact sheet N°104," *Media Cent. Tuberc.*, pp. 1–5, 2016.
- [5] M. P. R. Berry, S. Blankley, C. M. Graham, C. I. Bloom, and A. O'Garra, "Systems approaches to studying the immune response in tuberculosis," *Current Opinion in Immunology*, vol. 25, no. 5. pp. 579–587, 2013.
- [6] M. Pai *et al.*, "Tuberculosis," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 2, p. 16076, Oct. 2016.
- [7] P. L. Lin and J. L. Flynn, "Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target," *J. Immunol.*, vol. 185, no. 1, pp. 15–22, 2010.
- [8] J. Becq *et al.*, "Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1861–1871, 2007.
- [9] J. B. Torrelles and L. S. Schlesinger, "Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannose cell wall determinants impacts adaptation to the host.," *Tuberculosis (Edinb.)*, vol. 90, no. 2, pp. 84–93, Mar. 2010.
- [10] D. Kaur, M. E. Guerin, H. Skovierová, P. J. Brennan, and M. Jackson, "Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis.," *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 69, pp. 23–78, 2009.
- [11] L. Brown, J. M. Wolf, R. Prados-Rosales, and A. Casadevall, "Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, no. 10, pp. 620–630, 2015.
- [12] S. Gagneux and P. M. Small, "Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development," *Lancet Infectious Diseases*, vol. 7, no. 5. pp. 328–337, 2007.
- [13] W. Sougakoff, "Molecular epidemiology of multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis.," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 17, no. 6, pp. 800–5, 2011.
- [14] M. P. Nicol and R. J. Wilkinson, "The clinical consequences of strain diversity in Mycobacterium tuberculosis," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 102, no. 10. pp. 955–965, 2008.
- [15] S. T. Cole *et al.*, "Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence," *Nature*, vol. 393, no. 6685. pp. 537–544, 1998.
- [16] M. Coscolla and S. Gagneux, "Does M. tuberculosis genomic diversity explain disease diversity?," *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, vol. 7, no. 1. 2010.

- [17] Y. Zhang, "The magic bullets and tuberculosis drug targets," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 45, pp. 529–564, 2005.
- [18] J. A. Caminero, "Multidrug-resistant tuberculosis: epidemiology, risk factors and case finding," *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, vol. 14, no. 4, pp. 382–390, 2010.
- [19] A. Matteelli, G. B. Migliori, D. Cirillo, R. Centis, E. Girard, and M. Raviglion, "Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 5, no. 5, pp. 857–71, Oct. 2007.
- [20] "WHO Global Tuberculosis Report 2017."
- [21] A. S. Juan Carlos Bossio, Hugo Fernandez, R. Ainelen, R. Luciana, and G. Nilva, "Notificación de casos de tuberculosis en la República Argentina. Período 1980-2015," 2016.
- [22] J. Aita *et al.*, "Hospital transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Rosario, Argentina," *Medicina (B. Aires)*, vol. 56, no. 1, pp. 48–50, 1996.
- [23] V. Ritacco *et al.*, "Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires," *J. Infect. Dis.*, vol. 176, no. 3, pp. 637–642, 1997.
- [24] D. Palmero *et al.*, "Multidrug-resistant tuberculosis in HIV-negative patients, Buenos Aires, Argentina," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 9, no. 8, pp. 965–969, 2003.
- [25] D. Palmero *et al.*, "Multidrug-resistant tuberculosis outbreak among transvestite sex workers, Buenos Aires, Argentina," *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, vol. 9, no. 10, pp. 1168–1170, 2005.
- [26] V. Ritacco *et al.*, "HIV infection and geographically bound transmission of drug-resistant Tuberculosis, Argentina," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 11, pp. 1802–1810, 2012.
- [27] S. Borrell and S. Gagneux, "Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*," *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, vol. 13, no. 12, pp. 1456–1466, 2009.
- [28] N. Morcillo *et al.*, "Multidrug resistant tuberculosis outbreak in Buenos Aires: DNA fingerprinting analysis of isolates," *Medicina (B. Aires)*, vol. 56, no. 1, pp. 45–47, 1996.
- [29] V. Ritacco *et al.*, "Conspicuous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 12, no. 4, pp. 711–717, 2012.
- [30] V. Eldholm *et al.*, "Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 7119, 2015.
- [31] M. de Martino, L. Galli, and E. Chiappini, "Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein?," *BMC Infect. Dis.*, vol. 14, no. Suppl 1, p. S1, 2014.
- [32] J. Dietrich and T. M. Doherty, "Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with the host: Consequences for vaccine development," *APMIS*, vol. 117, no. 5–6, pp. 440–457, 2009.
- [33] S. Jozefowski, A. Sobota, and K. Kwiatkowska, "How *Mycobacterium tuberculosis* Subverts Host Immune Responses," *BioEssays*, vol. 30, no. 10, pp. 943–954, 2008.
- [34] P. J. Cardona and J. Ivanyi, "The secret trumps, impelling the pathogenicity of tubercle

- bacilli," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 29, no. SUPPL. 1, pp. 14–19, 2011.
- [35] S. Ahmad, "Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2011, 2011.
- [36] L. Ramakrishnan, "Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis," *Nat. Rev. Immunol.*, 2012.
- [37] S. Ehlers and U. E. Schaible, "The granuloma in tuberculosis: Dynamics of a host-pathogen collusion," *Frontiers in Immunology*, vol. 3, no. JAN. 2012.
- [38] M. M. Hossain and M.-N. Norazmi, "Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection--the double-edged sword?," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, p. 179174, 2013.
- [39] D. G. Russell, P.-J. Cardona, M.-J. Kim, S. Allain, and F. Altare, "Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma," *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 9, pp. 943–948, 2009.
- [40] M. C. Chao and E. J. Rubin, "Letting Sleeping *dos* Lie: Does Dormancy Play a Role in Tuberculosis?," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 64, no. 1, pp. 293–311, 2010.
- [41] J. D. Ernst, "The immunological life cycle of tuberculosis," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 8, pp. 581–591, 2012.
- [42] B. M. Saunders and W. J. Britton, "Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 85, no. 2, pp. 103–111, 2007.
- [43] J. D. Miller *et al.*, "Human Effector and Memory CD8+ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines," *Immunity*, vol. 28, no. 5, pp. 710–722, 2008.
- [44] A. M. Cooper, "Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, no. 1, pp. 393–422, 2009.
- [45] S. H. E. Kaufmann, "Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 61, no. Supplement 2, p. 54ii–58, 2002.
- [46] W. J. Howat, T. Barabás, J. A. Holmes, S. T. Holgate, and P. M. Lackie, "Distribution of basement membrane pores in bronchus revealed by microscopy following epithelial removal," *J. Struct. Biol.*, vol. 139, no. 3, pp. 137–145, 2002.
- [47] R. R. Mercer, M. L. Russell, V. L. Roggli, and J. D. Crapo, "Cell number and distribution in human and rat airways.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 613–624, 1994.
- [48] D. Spina, "Epithelium smooth muscle regulation and interactions," in *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, vol. 158, no. 5 III.
- [49] M. W. Leigh, "The airway epithelium: Physiology, pathophysiology and pharmacology. Stephen G. Farmer and Douglas W.P. Hay, eds. New York: Marcel Dekker, 1991, 680 pp," *Pediatr. Pulmonol.*, vol. 21, no. 4, pp. 262–263, Apr. 1996.
- [50] D. A. Knight and S. T. Holgate, "The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease," *Respirology*, vol. 8, no. 4, pp. 432–446, 2003.
- [51] P. K. Jeffery, "Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands," *Am Rev Respir Dis*, vol. 128, no. 2 Pt 2, pp. S14-20, 1983.

- 
- [52] J. A. Whitsett and T. Alenghat, "Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity," *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 1, pp. 27–35, 2014.
- [53] S. E. Evans, Y. Xu, M. J. Tuvim, and B. F. Dickey, "Inducible Innate Resistance of Lung Epithelium to Infection," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 72, no. 1, pp. 413–435, 2010.
- [54] A. Kato and R. P. Schleimer, "Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity," *Current Opinion in Immunology*, vol. 19, no. 6, pp. 711–720, 2007.
- [55] E. Tenland *et al.*, "Innate Immune Responses after Airway Epithelial Stimulation with Mycobacterium bovis Bacille-Calmette Guerin," *PLoS One*, vol. 11, no. 10, p. e0164431, 2016.
- [56] Q. Sha, A. Q. Truong-Tran, J. R. Plitt, L. A. Beck, and R. P. Schleimer, "Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 31, no. 3, pp. 358–364, 2004.
- [57] Y. Li, Y. Wang, and X. Liu, "The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, 2012.
- [58] R. Bals and P. S. Hiemstra, "Innate immunity in the lung: How epithelial cells fight against respiratory pathogens," *European Respiratory Journal*, vol. 23, no. 2, pp. 327–333, 2004.
- [59] M. I. Gómez and A. Prince, "Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens," *Pediatric Pulmonology*, vol. 43, no. 1, pp. 11–19, 2008.
- [60] R. G. Crystal, S. H. Randell, J. F. Engelhardt, J. Voynow, and M. E. Sunday, "Airway epithelial cells: current concepts and challenges," *Proc Am Thorac Soc*, vol. 5, no. 7, pp. 772–777, 2008.
- [61] C. M. Greene and N. G. Mcelvaney, "Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells," *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, vol. 53, pp. 418–427, 2005.
- [62] B. Opitz *et al.*, "Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 35, pp. 36426–32, 2004.
- [63] W.-K. Sun *et al.*, "Dectin-1 is inducible and plays a crucial role in Aspergillus-induced innate immune responses in human bronchial epithelial cells," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 31, no. 10, pp. 2755–2764, Oct. 2012.
- [64] D. Parker and A. Prince, "Innate immunity in the respiratory epithelium," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 45, no. 2, pp. 189–201, 2011.
- [65] R. Adamo, S. Sokol, G. Soong, M. I. Gomez, and A. Prince, "Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 30, no. 5, pp. 627–634, 2004.
- [66] B. Schmeck *et al.*, "Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 290, pp. L730–L737, 2006.
- [67] A. Muir *et al.*, "Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells," *Am.*

- J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 30, no. 6, pp. 777–783, 2004.
- [68] R. M. Strieter, “Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium,” *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 283, no. 4, pp. L688–L689, Oct. 2002.
- [69] P. Cooper, S. Potter, B. Mueck, S. Yousefi, and G. Jarai, “Identification of genes induced by inflammatory cytokines in airway epithelium,” *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 280, no. 5, pp. L841–52, 2001.
- [70] C. M. Greene *et al.*, “TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells,” *J. Immunol.*, vol. 174, no. 3, pp. 1638–46, 2005.
- [71] M. M. Monick *et al.*, “Respiratory Syncytial Virus Up-regulates TLR4 and Sensitizes Airway Epithelial Cells to Endotoxin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 52, pp. 53035–53044, 2003.
- [72] T. Homma *et al.*, “Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 31, no. 4, pp. 463–469, 2004.
- [73] W. Gao *et al.*, “Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?,” *Respirology*, vol. 20, no. 5, pp. 722–729, 2015.
- [74] E. Arnett, N. Krishnan, B. D. Robertson, and L. S. Schlesinger, “Host Pathogen Biology for Airborne Mycobacterium tuberculosis,” in *Drug Delivery Systems for Tuberculosis Prevention and Treatment*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016, pp. 11–47.
- [75] L. P. Nicod, “Lung defences: an overview,” *Eur. Respir. Rev.*, vol. 14, no. 95, pp. 45–50, Dec. 2005.
- [76] J. L. Flynn and J. Chan, “Immunology of Tuberculosis,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 19, no. 1, pp. 93–129, Apr. 2001.
- [77] A. F. Tena and P. C. Clará, “Deposition of Inhaled Particles in Lungs,” *Arch Bronchoneumol*, vol. 48, no. 7, pp. 240–246, 2012.
- [78] J. B. Torrelles and L. S. Schlesinger, “Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis,” *Trends in Microbiology*, 2017.
- [79] B. Rivas-Santiago, J. C. L. Contreras, E. Sada, and R. Hernández-Pando, “The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis,” *Scand. J. Immunol.*, vol. 67, no. 5, pp. 448–52, May 2008.
- [80] R. Hernández-Pando *et al.*, “Persistence of DNA from Mycobacterium tuberculosis in superficially normal lung tissue during latent infection,” *Lancet*, vol. 356, pp. 2133–2138, 2000.
- [81] E. Guirado, L. S. Schlesinger, and G. Kaplan, “Macrophages in tuberculosis: Friend or foe,” *Seminars in Immunopathology*, vol. 35, no. 5, pp. 563–583, 2013.
- [82] M.-L. Lohmann-Matthes, C. Steinmüller, and G. Franke-Ullmann, “Pulmonary macrophages,” *Eur. Respir. J.*, vol. 7, no. 9, pp. 1678–1689, Sep. 1994.
- [83] J. Day, A. Friedman, and L. S. Schlesinger, “Modeling the immune rheostat of macrophages in the lung in response to infection,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no.

- 27, pp. 11246–11251, Jul. 2009.
- [84] J. M. Scordo, D. L. Knoell, and J. B. Torrelles, “Alveolar Epithelial Cells in Mycobacterium tuberculosis Infection: Active Players or Innocent Bystanders?,” *Journal of Innate Immunity*, vol. 8, no. 1. pp. 3–14, 2016.
- [85] K. A. McDonough and Y. Kress, “Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of Mycobacterium tuberculosis,” *Infect. Immun.*, vol. 63, no. 12, pp. 4802–4811, 1995.
- [86] K. M. Dobos, E. A. Spotts, F. D. Quinn, and C. H. King, “Necrosis of lung epithelial cells during infection with Mycobacterium tuberculosis is preceded by cell permeation,” *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 11, pp. 6300–6310, 2000.
- [87] D. M. Lowe, P. S. Redford, R. J. Wilkinson, A. O’Garra, and A. R. Martineau, “Neutrophils in tuberculosis: Friend or foe?,” *Trends in Immunology*, vol. 33, no. 1. pp. 14–25, 2012.
- [88] J. Arcos *et al.*, “Lung Mucosa Lining Fluid Modification of Mycobacterium tuberculosis to Reprogram Human Neutrophil Killing Mechanisms,” in *Journal of Infectious Diseases*, 2015, vol. 212, no. 6, pp. 948–958.
- [89] A. E. Brown, T. J. Holzer, and B. R. Andersen, “Capacity of human neutrophils to kill Mycobacterium tuberculosis.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 156, no. 6, pp. 985–9, Dec. 1987.
- [90] G. S. Jones, H. J. Amirault, and B. R. Andersen, “Killing of mycobacterium tuberculosis by neutrophils: A nonoxidative process,” *J. Infect. Dis.*, vol. 162, no. 3, pp. 700–704, 1990.
- [91] E. Guirado and L. S. Schlesinger, “Modeling the Mycobacterium tuberculosis granuloma - the critical battlefield in host immunity and disease,” *Front. Immunol.*, vol. 4, no. APR, 2013.
- [92] S. Jaillon, M. R. Galdiero, D. Del Prete, M. A. Cassatella, C. Garlanda, and A. Mantovani, “Neutrophils in innate and adaptive immunity.,” *Semin. Immunopathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 377–94, Jul. 2013.
- [93] B. Amulic, C. Cazalet, G. L. Hayes, K. D. Metzler, and A. Zychlinsky, “Neutrophil function: from mechanisms to disease.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, pp. 459–89, 2012.
- [94] A. W. Segal, “HOW NEUTROPHILS KILL MICROBES,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, no. 1, pp. 197–223, 2005.
- [95] R. S. Flannagan, G. Cosío, and S. Grinstein, “Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 5, pp. 355–366, 2009.
- [96] J. El-Benna, M. Hurtado-Nedelec, V. Marzaioli, J. C. Marie, M. A. Gougerot-Pocidaló, and P. M. C. Dang, “Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation,” *Immunological Reviews*, vol. 273, no. 1. pp. 180–193, 2016.
- [97] I. V Lyadova, “Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way?,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2017, p. 8619307, 2017.
- [98] T. N. Mayadas, X. Cullere, and C. A. Lowell, “The Multifaceted Functions of Neutrophils,”

- Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 9, no. 1, pp. 181–218, 2014.
- [99] V. Brinkmann, “Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria,” *Science (80-. )*, vol. 303, no. 5663, pp. 1532–1535, 2004.
- [100] D. L. Bratton and P. M. Henson, “Neutrophil clearance: When the party is over, clean-up begins,” *Trends in Immunology*, vol. 32, no. 8. pp. 350–357, 2011.
- [101] A. Mantovani, M. A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon, “Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 8, pp. 519–531, 2011.
- [102] R. Appelberg and M. T. Silva, “T cell-dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infections.,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 78, no. 3, pp. 478–83, 1989.
- [103] J. A. Barrios-Payán, M. Castañón-Arreola, M. A. Flores-Valdez, and R. Hernández-Pando, “Biological, clinical and epidemiological aspects of latent tuberculosis | Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente,” *Salud Publica Mex.*, vol. 52, no. 1, 2010.
- [104] P. Gonzalez-Cano *et al.*, “Double Edge Sword: The Role of Neutrophils in Tuberculosis,” in *Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity*, InTech, 2012.
- [105] A. R. Martineau *et al.*, “High-dose vitamin D(3) during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial.,” *Lancet (London, England)*, vol. 377, no. 9761, pp. 242–50, Jan. 2011.
- [106] B. Moldoveanu *et al.*, “Inflammatory mechanisms in the lung.,” *J. Inflamm. Res.*, vol. 2, pp. 1–11, 2009.
- [107] C. Summers, S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters, and E. R. Chilvers, “Neutrophil kinetics in health and disease,” *Trends in Immunology*, vol. 31, no. 8. pp. 318–324, 2010.
- [108] I. Sugawara, T. Udagawa, and H. Yamada, “Rat Neutrophils Prevent the Development of Tuberculosis,” *Infect. Immun.*, vol. 72, no. 3, pp. 1804–1806, 2004.
- [109] J. Barrios-Payan, D. Aguilar-Leon, R. Lascurain-Ledezma, and R. Hernandez-Pando, “[Neutrophil participation in early control and immune activation during experimental pulmonary tuberculosis],” *Gac Med Mex*, vol. 142, no. 4, pp. 273–281, 2006.
- [110] S. Bennouna, S. K. Bliss, T. J. Curiel, and E. Y. Denkers, “Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 11, pp. 6052–6058, 2003.
- [111] K. P. J. M. van Gisbergen, M. Sanchez-Hernandez, T. B. H. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk, “Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN,” *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 8, pp. 1281–1292, 2005.
- [112] K. O. Kisich, M. Higgins, G. Diamond, and L. Heifets, “Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of Mycobacterium tuberculosis by human neutrophils,” *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 8, pp. 4591–4599, 2002.

- [113] L. E. Bermudez and L. S. Young, "Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, is associated with macrophage killing of Mycobacterium avium complex.," *J. Immunol.*, vol. 140, pp. 3006–3013, 1988.
- [114] D. D. Riedel and S. H. E. Kaufmann, "Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with Mycobacterium tuberculosis and lipoarabinomannan," *Infect. Immun.*, vol. 65, no. 11, pp. 4620–4623, 1997.
- [115] R. M. Strieter *et al.*, "Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8.," *Am. J. Pathol.*, vol. 141, no. 2, pp. 397–407, 1992.
- [116] P. Kruger *et al.*, "Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury," *PLoS Pathogens*, vol. 11, no. 3, pp. 1–22, 2015.
- [117] J. Bordon *et al.*, "Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 17, no. 2, 2013.
- [118] F. R. Sheppard, M. R. Kelher, E. E. Moore, N. J. D. McLaughlin, A. Banerjee, and C. C. Silliman, "Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 78, no. November, pp. 1025–1042, 2005.
- [119] M. Uddin, G. Seumois, L. C. Lau, P. Ryttila, D. E. Davies, and R. Djukanović, "Enhancement of neutrophil function by the bronchial epithelium stimulated by epidermal growth factor," *Eur. Respir. J.*, vol. 31, no. 4, pp. 714–724, 2008.
- [120] J. D. Blischak, L. Tailleux, A. Mitrano, L. B. Barreiro, and Y. Gilad, "Mycobacterial infection induces a specific human innate immune response," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 16882, 2015.
- [121] H. J. Swanson KM, Petran RL, "Culture methods for enumeration of microorganisms," *Compend. methods Microbiol. Exam. foods. 4th Ed. Washington, D.C.*, pp. 53–67, 2001.
- [122] P. T. G. Elkington *et al.*, "Mycobacterium tuberculosis up-regulates matrix metalloproteinase-1 secretion from human airway epithelial cells via a p38 MAPK switch.," *J. Immunol.*, vol. 175, pp. 5333–5340, 2005.
- [123] S. Negrotto *et al.*, "Aspirin and salicylate suppress polymorphonuclear apoptosis delay mediated by proinflammatory stimuli," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 319, no. 2, pp. 972–979, 2006.
- [124] M. Alemán *et al.*, "Mycobacterium tuberculosis-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 27, no. 5, pp. 583–592, 2002.
- [125] A. Carestia *et al.*, "Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 99, no. 1, pp. 153–162, 2016.
- [126] M. J. Lapponi *et al.*, "Regulation of Neutrophil Extracellular Trap Formation by Anti-Inflammatory Drugs," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 345, no. 3, pp. 430–437, 2013.
- [127] Y. L. Zu *et al.*, "p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human

- neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation.," *J. Immunol.*, vol. 160, no. 4, pp. 1982–9, 1998.
- [128] D. Kim and C. L. Haynes, "The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression," *Analyst*, vol. 138, no. 22, p. 6826, 2013.
- [129] L. Balboa *et al.*, "Mycobacterium tuberculosis impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 88, no. 7, pp. 716–726, 2010.
- [130] D. Morris *et al.*, "An elucidation of neutrophil functions against Mycobacterium tuberculosis infection.," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2013, p. 959650, 2013.
- [131] W. Ratajczak-Wrona, E. Jablonska, M. Garley, J. Jablonski, P. Radziwon, and a Iwaniuk, "The role of MAP kinases in the induction of iNOS expression in neutrophils exposed to NDMA: the involvement transcription factors.," *Adv. Med. Sci.*, vol. 58, no. 2, pp. 265–73, 2013.
- [132] B. E. García-Pérez, R. Mondragón-Flores, and J. Luna-Herrera, "Internalization of Mycobacterium tuberculosis by macropinocytosis in non-phagocytic cells," *Microb. Pathog.*, vol. 35, no. 2, pp. 49–55, 2003.
- [133] L. Hall-Stoodley *et al.*, "Mycobacterium tuberculosis binding to human surfactant proteins A and D, fibronectin, and small airway epithelial cells under shear conditions," *Infect. Immun.*, vol. 74, no. 6, pp. 3587–3596, 2006.
- [134] L. E. Bermudez and J. Goodman, "Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells," *Infect. Immun.*, vol. 64, no. 4, pp. 1400–1406, 1996.
- [135] L. Danelishvili, J. McGarvey, Y.-J. Li, and L. E. Bermudez, "Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells.," *Cell. Microbiol.*, vol. 5, pp. 649–660, 2003.
- [136] E. H. Beachey and H. S. Courtney, "Bacterial adherence of group a streptococci to mucosal surfaces," *Respiration*, vol. 55, pp. 33–40, 1989.
- [137] J. W. St. Geme, "Molecular determinants of the interaction between Haemophilus influenzae and human cells," in *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1996, vol. 154, no. 4 II SUPPL.
- [138] G. Diamond, D. Legarda, and L. K. Ryan, "The innate immune response of the respiratory epithelium.," *Immunol. Rev.*, vol. 173, pp. 27–38, 2000.
- [139] V. Rubovitch, S. Gershnel, and M. Kalina, "Lung epithelial cells modulate the inflammatory response of alveolar macrophages," *Inflammation*, vol. 30, no. 6, pp. 236–243, 2007.
- [140] A. K. Mayer *et al.*, "Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells.," *J. Immunol.*, vol. 178, no. 5, pp. 3134–3142, 2007.
- [141] P. G. Bloemen *et al.*, "Stimulation of both human bronchial epithelium and neutrophils is needed for maximal interactive adhesion.," *Am. J. Physiol.*, vol. 270, pp. L80–L87, 1996.
- [142] P. T. Elkington *et al.*, "Synergistic Up-Regulation of Epithelial Cell Matrix Metalloproteinase-9 Secretion in Tuberculosis," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 37, no. 4, pp. 431–437, 2007.

- [143] C. Nathan, "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 3, pp. 173–182, 2006.
- [144] H. Sengeløv, L. Kjeldsen, M. S. Diamond, T. a Springer, and N. Borregaard, "Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils.," *J. Clin. Invest.*, vol. 92, no. 3, pp. 1467–1476, 1993.
- [145] K. Zeman, J. Kantorski, E. M. Paleolog, M. Feldmann, and H. Tchorzewski, "The role of receptors for tumour necrosis factor-alpha in the induction of human polymorphonuclear neutrophil chemiluminescence," *Immunol Lett*, vol. 53, no. 1, pp. 45–50, 1996.
- [146] D. Roos, R. Van Bruggen, and C. Meischl, "Oxidative killing of microbes by neutrophils," *Microbes and Infection*, vol. 5, no. 14, pp. 1307–1315, 2003.
- [147] E. Warren, G. Teskey, and V. Venketaraman, "Effector Mechanisms of Neutrophils within the Innate Immune System in Response to Mycobacterium tuberculosis Infection," *J. Clin. Med.*, vol. 6, no. 2, p. 15, 2017.
- [148] B. Corleis, D. Korbel, R. Wilson, J. Bylund, R. Chee, and U. E. Schaible, "Escape of Mycobacterium tuberculosis from oxidative killing by neutrophils," *Cell. Microbiol.*, vol. 14, no. 7, pp. 1109–1121, 2012.
- [149] G. Cox, J. Gauldie, and M. Jordana, "Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 507–513, 1992.
- [150] M. A. Firmani and L. W. Riley, "Reactive nitrogen intermediates have a bacteriostatic effect on Mycobacterium tuberculosis in vitro," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 9, pp. 3162–3166, 2002.
- [151] J. Altstaedt, H. Kirchner, and L. Rink, "Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8.," *Immunology*, vol. 89, no. 4, pp. 563–8, 1996.
- [152] M. J. Harriff *et al.*, "Human lung epithelial cells contain Mycobacterium tuberculosis in a late endosomal vacuole and are efficiently recognized by CD8+ T Cells," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, 2014.
- [153] O. T. Ashiru, M. Pillay, and A. W. Sturm, "Adhesion to and invasion of pulmonary epithelial cells by the F15/LAM4/KZN and Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis," *J. Med. Microbiol.*, vol. 59, no. 5, pp. 528–533, 2010.
- [154] J. Castro-Garza, W. E. Swords, R. K. Karls, and F. D. Quinn, "Dual mechanism for Mycobacterium tuberculosis cytotoxicity on lung epithelial cells.," *Can. J. Microbiol.*, vol. 58, no. 7, pp. 909–16, 2012.
- [155] H. Ohta, S. Chiba, M. Ebina, M. Furuse, and T. Nukiwa, "Altered expression of tight junction molecules in alveolar septa in lung injury and fibrosis," *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 302, no. 2, pp. L193–L205, 2012.
- [156] Y. Lin, M. Zhang, and P. F. Barnes, "Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis.," *Infect. Immun.*, vol. 66, no. 3, pp. 1121–6, 1998.
- [157] M. Andersson, N. Lutay, O. Hallgren, G. Westergren-Thorsson, M. Svensson, and G.

- Godaly, "Mycobacterium bovis bacilli Calmette-Guerin regulates leukocyte recruitment by modulating alveolar inflammatory responses," *Innate Immun.*, vol. 18, no. 3, pp. 531–540, 2012.
- [158] C. Tecchio, A. Micheletti, and M. A. Cassatella, "Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, no. OCT. 2014.
- [159] R. L. Zemans, S. P. Colgan, and G. P. Downey, "Transepithelial migration of neutrophils: Mechanisms and implications for acute lung injury," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 40, no. 5. pp. 519–535, 2009.
- [160] H. E. Volkman, T. C. Pozos, J. Zheng, J. M. Davis, J. F. Rawls, and L. Ramakrishnan, "Tuberculous Granuloma Induction via Interaction of a Bacterial Secreted Protein with Host Epithelium," *Science (80-. )*, vol. 327, no. 5964, pp. 466–469, 2010.
- [161] K. A. Keyes *et al.*, "Circulating angiogenic growth factor levels in mice bearing human tumors using Luminex Multiplex technology.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 51, no. 4, pp. 321–327, 2003.
- [162] D. Sheppard, "Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis.," *Proc. Am. Thorac. Soc.*, vol. 3, no. 5, pp. 413–417, 2006.
- [163] R. I. Sha'afi and T. F. Molski, "Activation of the neutrophil.," *Prog. Allergy*, vol. 42, pp. 1–64, 1988.
- [164] A. M. Condliffe, E. R. Chilvers, C. Haslett, and I. Dransfield, "Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function.," *Immunology*, vol. 89, no. 1, pp. 105–11, Sep. 1996.
- [165] C. Elbim, S. Bailly, S. Chollet-Martin, J. Hakim, and M. A. Gougerot-Pocidalò, "Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides," *Infect. Immun.*, vol. 62, no. 6, pp. 2195–2201, 1994.
- [166] M. C. Schechter *et al.*, "Neutrophil extracellular trap (NET) levels in human plasma are associated with active TB," *PLoS One*, vol. 12, no. 8, p. e0182587, Aug. 2017.
- [167] V. Ramos-Kichik *et al.*, "Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis," *Tuberculosis*, vol. 89, no. 1, pp. 29–37, 2009.
- [168] M. Denis, "Human neutrophils, activated with cytokines or not, do not kill virulent Mycobacterium tuberculosis.," *J. Infect. Dis.*, vol. 163, no. 4, pp. 919–20, Apr. 1991.
- [169] S. Y. Eum *et al.*, "Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB," *Chest*, vol. 137, no. 1, pp. 122–128, 2010.
- [170] J. T. Mattila, P. Maiello, T. Sun, L. E. Via, and J. L. Flynn, "Granzyme B-expressing neutrophils correlate with bacterial load in granulomas from Mycobacterium tuberculosis-infected cynomolgus macaques," *Cell. Microbiol.*, vol. 17, no. 8, pp. 1085–1097, 2015.
- [171] J. N. Hilda and S. D. Das, "TLR stimulation of human neutrophils lead to increased release of MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF during tuberculosis," *Hum. Immunol.*, vol. 77, no. 1, pp. 63–67, 2016.

- [172] K. Grattendick *et al.*, "Alveolar macrophage activation by myeloperoxidase: A model for exacerbation of lung inflammation," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 26, no. 6, pp. 716–722, 2002.
- [173] M. Whiteman, D. C. Hooper, G. S. Scott, H. Koprowski, and B. Halliwell, "Inhibition of hypochlorous acid-induced cellular toxicity by nitrite.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 19, pp. 12061–6, 2002.
- [174] J. K. Sia, M. Georgieva, and J. Rengarajan, "Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between Mycobacterium tuberculosis and Innate Immune Cells," *Journal of Immunology Research*, vol. 2015, 2015.