



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

**“Papel de CD43 en el reconocimiento de Cpn60.2 de  
*Mycobacterium tuberculosis* por linfocitos T”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**DEN ALEJANDRO ALVARADO VELÁZQUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay**

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2021



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

**“Papel de CD43 en el reconocimiento de Cpn60.2 de  
*Mycobacterium tuberculosis* por linfocitos T”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**DEN ALEJANDRO ALVARADO VELÁZQUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay**

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2021

## **Miembros del jurado**

**Presidente:** Dr. Rogelio Hernández Pando

**Secretario:** Dra. María Angélica Santana Calderón

**Vocal:** Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

**Suplente:** Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez

**Suplente:** Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.

Para su realización, el proyecto contó con fondos provenientes de los proyectos PAPIITIN212716 e IN212519, CONACYT 220990 y A1-S-15601

DAAV fue apoyado por una beca de CONACYT (# de becario: 894574) para realizar una maestría en el Posgrado en Ciencias, del IICBA de la UAEM, Morelos.

Al Centro Regional para la Transfusión Sanguínea en Cuernavaca, Morelos, y a los donadores anónimos por contribuir con la materia prima para los experimentos.

## **ABSTRACT**

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is the etiologic agent of tuberculosis, a prevalent disease that mainly affects lungs and claims the lives of approximately 1.4 million people worldwide each year. After being infected, some people may develop “progressive primary tuberculosis” or latent infection, characterized by granulomas formation. Among the plethora of cells forming the granuloma, immune cells (alveolar macrophages (MΦ), foamy cells, multinucleated cells, neutrophils, T lymphocytes CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> and B lymphocytes) contribute to the architecture and function of this structure. The granuloma function is to encapsulate Mtb and thus to prevent Mtb spreading. Activated MΦ and dendritic cells (DC) induce T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>2 and Treg responses. Particularly, T<sub>H</sub>1 cells are the major IFN-γ producers, whose function is to enhance the microbicidal activities to lessen and eliminate the pathogen. Moreover, T<sub>H</sub>17 cells secrete IL-17, a cytokine that promotes other inflammatory cytokines production and the recruitment of monocytes and neutrophils to the granuloma.

Cpn60.2 is an essential chaperonine for Mtb growth, localized in the cytosol and the external wall of Mtb, when under stress conditions. In the latter it is an adhesin that favors the interaction with macrophages through the sialomucin CD43. CD43 is a highly sialylated glycoprotein expressed on all lymphoid cells and modulates T cells activation, by lowering the activation threshold and directing T cells towards a T<sub>H</sub>1 phenotype. Recently, our laboratory demonstrated that the interaction CD43-Cpn60.2 leads to TNF production by both human and murine macrophages (Torres-Huerta *et al.* 2017). In addition, compared with their WT counterparts, CD43<sup>-/-</sup> mice have been reported to fail to produce IFN-γ and IL-17 when challenged with Mtb (unpublished data). The present study aimed to determine how Cpn60.2 impacts on human T cells activation responses. Activation was assessed by monitoring the expression levels of activation markers (CD69, CD40L, CD25, OX40 and PD-1) and cytokine production at 24 and 72 hours following activation with the TCR, TCR+CD28 or TCR+CD23 crosslinking. Overall, we found that Cpn60.2 inhibits T cell activation, both at the expression level of activation markers and the cytokine production level, particularly in the TCR+CD43 activated cells. Additionally, we found that Cpn60.2 negatively regulates both pro and anti-inflammatory, cytokines production from human T cells.

## **RESUMEN**

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es el agente etiológico de la tuberculosis, una enfermedad prevalente que afecta principalmente los pulmones y aproximadamente mueren 1.4 millones de personas anualmente en todo el mundo. Después de infectarse, algunos individuos pueden desarrollar “tuberculosis primaria progresiva” o una infección latente, caracterizada por la formación de granulomas. Entre la gran variedad de células que forman los granulomas, las células inmunes: macrófagos alveolares (MΦ), células espumosas, células multinucleadas, neutrófilos, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y linfocitos B, contribuyen con la arquitectura y función de estas estructuras. La función de los granulomas es encapsular a Mtb y de tal forma evitar su dispersión. Los MΦ y células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) inducen respuestas tipo T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>2 y Treg. Particularmente, las células T<sub>H</sub>1 son las principales productoras de IFN-γ, cuya función es potenciar las actividades microbidas para reducir y eliminar al patógeno. Además, las células T<sub>H</sub>17 secretan IL-17, una citocina que promueve la producción de otras citocinas proinflamatorias y el reclutamiento de monocitos y neutrófilos hacia el granuloma.

Cpn60.2 cuando se localiza en el citosol de Mtb es una chaperonina esencial para el crecimiento de Mtb y en condiciones de estrés se localiza en la pared externa. En esta última localización, funciona como adhesina que favorece la interacción con los macrófagos a través de la sialomucina CD43. CD43 es una glicoproteína altamente glicosilada expresada en todas las células linfoides. Esta sialomucina modula la activación de células T debido a la disminución en el umbral de activación y por el direccionamiento de las células T hacia un fenotipo T<sub>H</sub>1. Recientemente, nuestro laboratorio demostró que la interacción CD43-Cpn60.2 conduce hacia la producción de TNF tanto en macrófagos humanos como murinos (Torres-Huerta *et al.* 2017). Además, en comparación con sus contrapartes WT, se ha reportado que los ratones CD43<sup>-/-</sup> fallan en producir IFN-γ e IL-17 cuando son desafiados con Mtb (datos no publicados). El trabajo presente busca determinar cómo Cpn60.2 impacta en las respuestas de activación de los linfocitos T humanos. El estado de activación fue determinado por el monitoreo en la expresión de marcadores de activación (CD69, CD40L, CD25, OX40 y PD-1) y por la producción de citocinas a las 24 y 72 horas después de la activación por entrecruzamiento del TCR, TCR+CD28 o TCR+CD43. En general, encontramos que Cpn60.2 inhibe la activación de los linfocitos T tanto al nivel de la expresión de los marcadores de activación y la producción de citocinas, particularmente en las células activadas por TCR+CD43. Adicionalmente, encontramos que Cpn60.2 regula negativamente la producción de citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias en células T humanas.

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

El trabajo que hoy tienen en sus manos, es resultado de arduo trabajo y de increíbles e inolvidables experiencias. Durante la realización de este proyecto, conocí a mucha gente maravillosa, hice nuevas amistades y me ha sido gratificante de muchas formas, puesto que he crecido académica, profesional y personalmente. Es por eso que quiero dedicar este trabajo a mi familia: a Esperanza mi querida madre por todo su apoyo, cariño, amor y comprensión, a mi abuela Amelia por todo su amor incondicional y cuidados, a mi hermano Khent por todo su apoyo y porras, a todos mis tíos y primos por apoyarme y siempre creer en mí y a mi hermosa novia Liz por todo su amor sincero, porque desde que nos conocimos cambió mi vida y ha hecho de mí un mejor hombre, un hombre fuerte y lleno de convicciones. Un hombre seguro, seguro de que juntos podemos lograr lo que sea. También quiero dedicar este trabajo a mis amigos: a Darío, mi mejor amigo porque de ti he aprendido a valorar las pequeñas cosas que en ocasiones pasan desapercibidas, admiro tu manera de ver y afrontar la vida y gracias por todos tus consejos y amistad incondicional. A mis amigos de laboratorio que son parte de mi familia Iván, Sara, Alicia, Vero, Daniela, Erika, Ángel y Steph, gracias a todos por su amistad y las experiencias vividas. A Nachito, Álvaro y Montse, a ustedes mis maestros y grandes amigos, gracias por su amistad, sus enseñanzas y por ayudarme a lo largo de toda la maestría, sin ustedes nada de esto hubiera sido igual.

Por otra parte, quiero agradecer profundamente a mi tutora Yvonne Rosenstein, gracias a usted este trabajo fue posible, le agradezco haber confiado en mí, por recibirme con las manos abiertas y dejarme formar parte de este gran equipo el "Lab YR". También le agradezco su sinceridad y los regañones bien ganados, gracias a ellos me ha hecho crecer y ser mejor de lo que ayer era, gracias por preocuparse por todos nosotros "su equipo". A mis sinodales: a la Dra. Santana, al Dr. Mario y al Dr. Rogelio, por sus observaciones y comentarios, porque por personas como ustedes es que uno se enamora y apasiona por la ciencia.

A la M. en C. Erika Melchy, quien además de ser mi amiga, es la persona encargada de la unidad de citometría de flujo, gracias por todo el apoyo técnico que me brindaste, desde cultivo celular hasta citometría de flujo. Al el Dr. Ángel, mi amigo y de quien recibí gran apoyo técnico en epifluorescencia, agradezco sus observaciones y comentarios enriquecedores. Por último, quiero agradecer a todas las áreas y miembros del Instituto de Biotecnología: agradezco el apoyo brindado por servicios escolares, servicios generales, al área de cómputo y redes, a biblioteca, a los vigilantes, intendencia y al resto de las áreas, porque sin ustedes nuestras investigaciones no serían posibles. De igual manera, agradezco a la UNAM y a mi alma mater: la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, gracias por apostar por jóvenes como nosotros y pese a las adversidades no han dejado desamparados a todos sus estudiantes. Por último, agradezco al posgrado en ciencias del IICBA, a todos los integrantes de este gran posgrado tanto administrativos como académicos. Agradezco su apoyo en cada paso de este viaje. A Cristina y Verónica (secretaría del posgrado en ciencias), a Mayumi (servicios escolares), quienes me apoyaron en todos los trámites y brindaron información oportuna. Al final del día quiero que hacerles saber que este trabajo no es sólo mío, es también de ustedes, de todas las personas que durante estos dos años o más han estado ahí, formando parte de mi día a día. **GRACIAS A TODOS...**

## INDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE SIGLAS Y ABREVIACIONES</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
Generalidades.....	12
Participación de los linfocitos T en infección por Mtb .....	16
Papel de las moléculas co-receptoras en la activación de linfocitos T en el contexto de la infección por Mtb. ....	19
CD28.....	20
CD43.....	22
CD69.....	27
CD40L .....	29
CD25.....	32
OX40.....	34
PD-1.....	35
Cpn60.2: un PAMP con funciones inmunomoduladoras? .....	37
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>40</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
General.....	41
Particulares.....	41
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>42</b>
Cultivo Celular.....	42
Evaluación de pureza .....	42
Evaluación del estado de activación de los linfocitos T: marcadores de activación .....	43
Ensayo de Apoptosis (Viability Dye-Annexine V).....	45
Cuantificación de citocinas por Multiplex.....	46
Pruebas Estadísticas .....	47
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
1. Cpn60.2 no afecta la viabilidad de los linfocitos T pero sí su estado de activación, particularmente en respuesta al estímulo TCR+CD43.....	48

2. Cpn60.2 regula negativamente la expresión de marcadores de activación, especialmente en linfocitos T activados por TCR+CD43.....	52
3. Cpn60.2 regula la producción de citocinas en linfocitos T activados por TCR+CD43	56
<b>DISCUSION.....</b>	<b>59</b>
1. Cpn60.2 no afecta la viabilidad de los linfocitos T pero sí su estado de activación, particularmente en respuesta al estímulo TCR+CD43.....	60
2. Cpn60.2 regula negativamente la expresión de marcadores de activación, especialmente en linfocitos T activados por TCR+CD43.....	62
3. Cpn60.2 regula la producción de citocinas en linfocitos T activados por TCR+CD43	65
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>73</b>
<b>APENDICE .....</b>	<b>75</b>
Figuras suplementarias .....	75
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>80</b>

## **LISTA DE SIGLAS Y ABREVIACIONES**

**Mtb:** *Mycobacterium tuberculosis*

**MΦ:** macrófagos alveolares

**DC:** células dendríticas

**PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos

**PRRs:** receptores de reconocimiento de patrones

**TLRs:** receptores tipo Toll

**NLRs:** receptores tipo NOD

**CLRs:** receptores de lectina tipo C

**MGC:** células multi-nucleadas gigantes

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**APCs:** células presentadoras de antígeno

**MHC:** complejo principal de histocompatibilidad

**BCG:** bacillo Calmette-Guerin

**PIP<sub>2</sub>:** fosfatidil-inositol (3, 4)-bifosfato

**PIP<sub>3</sub>:** fosfatidil-inositol (3, 4, 5)-trifosfato

**IP<sub>3</sub>:** inositol-1, 4, 5 trifosfato

**DAG:** diacilglicerol

**GEF:** intercambiadores de nucleótidos de guanina

**GVHD:** enfermedad de hospedero contra injerto

**TNFR:** receptores de TNF

**PKM2:** isoforma M2 de la piruvato cinasa

**PSGL-1:** glicoproteína de membrana ligando de P-Selectina 1

**S1P<sub>1</sub>:** receptor 1 de esfingosina 1-fosfato

**Gal-1:** galectina-1

**CC:** contacto cercano

**sCD25:** CD25 soluble

**IDO:** indoleamina 2, 3-dioxigenasa

**D4GDI:** factor soluble inhibidor de disociación Rho GDP

**CRDs:** dominios ricos en cisteínas

**ITIM:** motivo de inmuno-receptor de cambio basado en tirosina

**ITSM:** motivo de inmuno-receptor de cambio basado en tirosina

**PBMCs:** células mononucleares de sangre periférica

**FBS:** suero fetal bovino

**NBS:** suero de bovino recién nacido

**PSG:** penicilina, estreptomicina y glutamina

**ST:** sin teñir

**PFA:** paraformaldehído

**T.A.:** temperatura ambiente

**US:** sin estimular

**MFI:** intensidad media de fluorescencia

**iMFI:** intensidad media de fluorescencia integrado

**BUA:** buffer de unión de anexina

**BALF:** fluídos de lavado bronqueoalveolar

**RNS:** especies reactivas de nitrógeno

**MDR:** multi-drogo resistente

## **INTRODUCCIÓN**

### **Generalidades**

Mtb es el agente causante de la tuberculosis, una enfermedad que afecta principalmente al pulmón y que, en pacientes inmunosuprimidos o inmunodeficientes, la micobacteria puede llegar a diseminarse a otros órganos, como los órganos linfoides, los huesos, las meninges y el tracto genitourinario (Harisinghani *et al.* 2000). Esta enfermedad afecta a millones de personas cada año. Tan sólo en el año 2019, la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) estimó la ocurrencia de 10 millones de nuevos casos y la muerte de 1.4 millones de personas (WHO, 2020). En México, durante el año 2019, el promedio de incidencias fue de 30,000 casos, con una tasa promedio de incidencia de 23 casos/100,000 habitantes, el promedio de mortalidad fue de 1800 casos HIV-negativos y 760 HIV-positivos, con una tasa promedio de mortalidad de 1.4 casos HIV-negativos/100,000 habitantes y 0.6 casos HIV-positivos/100,000 habitantes (WHO, 2019).

El contexto de activación de los mediadores de la inmunidad determinará si los individuos infectados por Mtb podrán eliminar al patógeno o bien solo contenerlo. Tras la inhalación de aerosoles, algunos individuos desarrollan rápidamente la enfermedad, conocida como “enfermedad primaria” o “tuberculosis primaria progresiva”, la cual afecta normalmente a niños y en ocasiones adultos (Frieden *et al.* 2003). Por lo general, los individuos colonizados por la micobacteria desarrollan una infección latente, en ocasiones asintomática, caracterizada por la formación de granulomas, que son estructuras cerradas con una estructura bien definida y en la que participan numerosas células de la respuesta inmunológica. En un porcentaje de los pacientes (5-10%) con tuberculosis latente, cuando la carga bacteriana es mayor a la soportada por los granulomas, se puede llegar a desarrollar una reactivación o “tuberculosis post-primaria” (O'Garra *et al.* 2013).

El establecimiento de la infección ocurre tras el ingreso de la micobacteria al pulmón debido a la inhalación de aerosoles o gotículas expulsadas por individuos

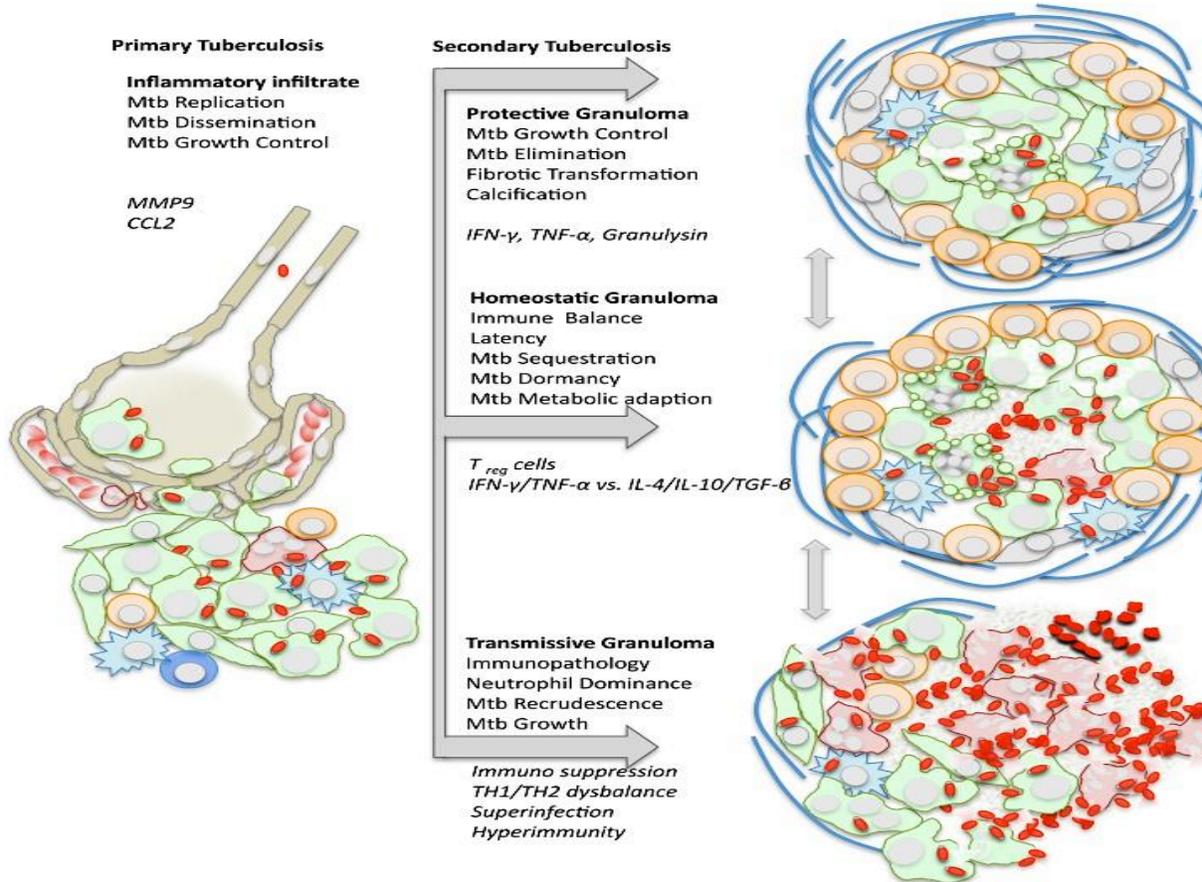
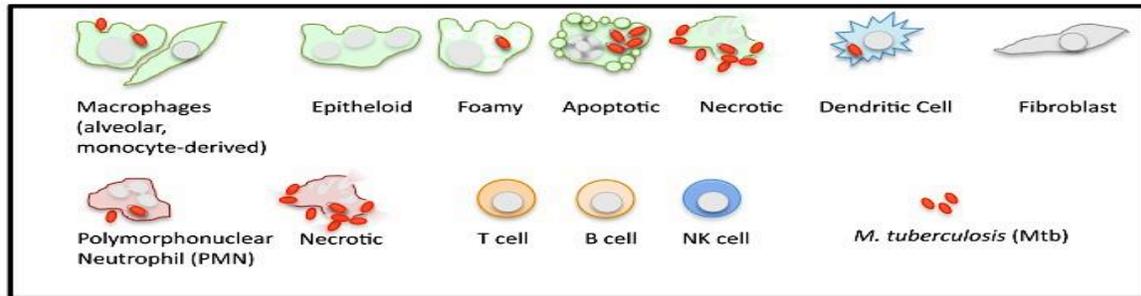
con tuberculosis activa. En el tejido pulmonar, los M $\Phi$ , los neutrófilos y las DCs reconocen múltiples moléculas de la pared de la micobacteria, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), a través de sus receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) extracelulares e intracelulares. Entre los PRRs que participan en el reconocimiento del bacilo, se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés), los receptores tipo NOD (NLRs, por sus siglas en inglés) y los receptores de lectina tipo C (CLRs, por sus siglas en inglés), donde cada uno reconoce distintos componentes micobacterianos. Por ejemplo, TLR2 reconoce a las lipoproteínas LpqH, LprA y LprG, así como los glicolípidos lipomanano y lipoarabinomanano (Hossain and Norazmi 2013) y las chaperonas moleculares Cpn60.2 (Hsp65) y DnaK (Bulut *et al.* 2005). Además de reconocer lipopolisacáridos, TLR4 también reconoce a Cpn60.2 (Bulut *et al.* 2005) y NOD2 reconoce muramil dipéptidos con grupos N-glicoil (Hossain and Norazmi 2013). Como resultado de las interacciones PRRs – PAMPs, se activan una serie de vías de señalización intracelular que convergen en la activación del inflamosoma, fagocitosis, apoptosis y autofagia, así como en la translocación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, AP-1 y NFAT al núcleo, en donde regulan la expresión de citocinas y quimiocinas. Además de las células y mecanismos de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa juega un papel esencial en el desarrollo y control de la enfermedad, de tal forma que la eliminación del patógeno depende del trabajo conjunto de la respuesta inmune innata y adaptativa así como En conjunto, estos mecanismos participan en la eliminación del patógeno (Pieters 2008).

A su vez, Mtb desencadena una larga y compleja serie de eventos para sobrevivir (y prosperar) en los macrófagos, reflejado esto en el desarrollo de mecanismos que bloquean la respuesta inmunitaria. Algunos de estos mecanismos son la modulación de los fagosomas, la neutralización de las moléculas efectoras de los macrófagos, la interferencia con el procesamiento de antígenos para su presentación a las células T y la secreción de múltiples citocinas con actividades tanto pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12 y TNF) como inhibitorias de los procesos de inflamación (IFNs tipo I, IL-10 y TGF- $\beta$ ). En conjunto, los procesos propios del

hospedero y los propios de la micobacteria contribuyen a definir un microambiente cuyo balance final es determinante para la erradicación o permanencia de la micobacteria en el pulmón (Liu *et al.* 2017).

En los granulomas se distinguen una zona central y una zona periférica bien definidas. La zona central alberga macrófagos infectados, macrófagos espumosos, células multi-nucleadas gigantes (MGC, por sus siglas en inglés) y neutrófilos. Esta zona se caracteriza por un ambiente pro-inflamatorio, en el que participan moléculas como catelicidina, activadores de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), leucotrieno B4 y TNF. En la zona periférica están presentes linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, linfocitos B y fibroblastos que participan en la generación de la cápsula fibrosa. La acción combinada de estas células y moléculas favorece un ambiente anti-inflamatorio donde participan también las enzimas COX-1/2 que promueven la conversión de eicosanoides en prostanoïdes (Peters and Ernst 2003, Marakalala *et al.* 2016).

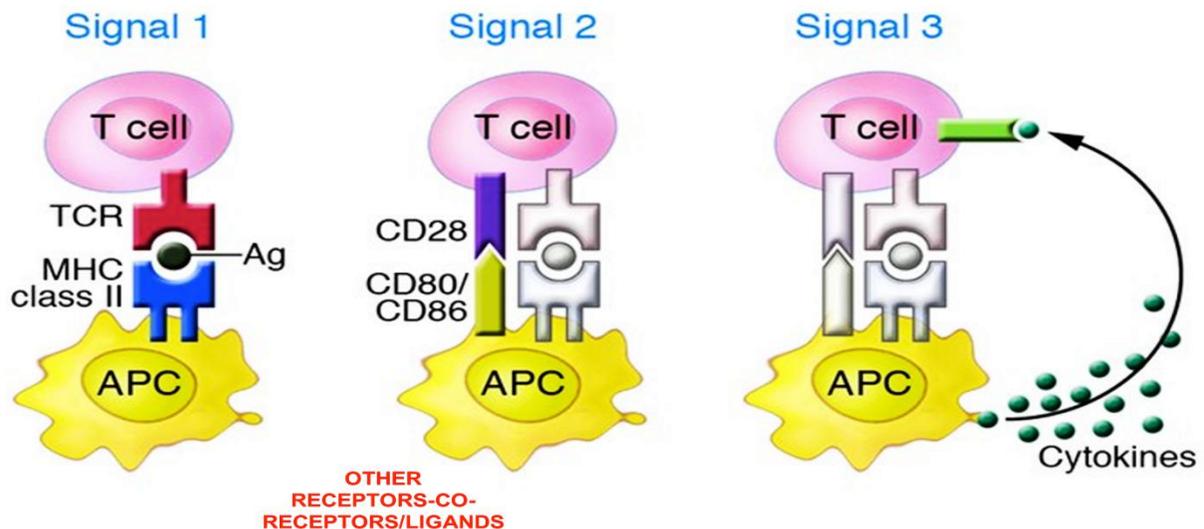
De acuerdo con el microambiente, los granulomas pueden sufrir cambios y convertirse en granulomas caseosos, los cuales se caracterizan por presentar un ambiente hipóxico y por la muerte de macrófagos vía necrosis y la subsecuente liberación de lípidos y colesterol acumulados por las células espumosas. Por último, el núcleo caseoso de estos granulomas puede sufrir un proceso de licuefacción, lo que dará como resultado el proceso conocido como cavitación. En este proceso el granuloma pierde la estructura que mantenía aislada a la micobacteria y el contenido de los granulomas licuados entra en contacto con las vías aéreas adyacentes. De esta forma, la micobacteria puede diseminarse a través de las gotículas expulsadas por los individuos infectados, perpetuando el ciclo de vida de la micobacteria (**Fig. 1**) (Ehlers and Schaible 2012).



**Figura 1. Formación y evolución de los granulomas en respuesta a la infección por Mtb.** Durante la infección por Mtb los macrófagos alveolares fagocitan a la micobacteria tras su ingreso a los pulmones y posteriormente, secretan MMP9 y quimio-atractivos que permiten el reclutamiento de otros tipos celulares, como lo son neutrófilos, DCs y células NK. En conjunto todos estos elementos participan en la construcción del granuloma, proceso en el cual los linfocitos T participan igualmente secretando citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF, las cuales contribuyen a mantener la estructura del granuloma. Si el balance final entre las señales pro y anti-inflamatorias es adecuado, la micobacteria puede eliminarse o contener su crecimiento (*granulomas protectores*) o bien puede mantenerse en latencia y secuestrada dentro de los *granulomas homeostáticos*. Sin embargo, un desbalance entre las señales pro o anti-inflamatorias hacia cualquier lado de la balanza, dará lugar a la pérdida de integridad del granuloma (*granulomas transmisivos*) por inducir necrosis en los macrófagos y la cavitación de los granulomas, y en consecuencia la micobacteria se diseminará por el pulmón y se transmitirá, perpetuando su ciclo de vida. Imagen tomada de Ehlers and Schaible 2012.

## Participación de los linfocitos T en infección por Mtb

La interacción de las células T y los macrófagos infectados es fundamental para la inmunidad protectora contra Mtb. La fagocitosis de la micobacteria por las células presentadoras de antígeno (APCs, por sus siglas en inglés) en el pulmón da lugar al procesamiento de múltiples antígenos que serán presentados a los linfocitos T por estas mismas APCs, en el nodo linfático pulmonar más cercano (Wolf *et al.* 2008). Durante la presentación de antígenos, los linfocitos T son estimulados a través de tres tipos de señales: aquellas proporcionadas por los antígenos cargados en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y reconocidos por el TCR, las señales inducidas por los receptores para las diferentes citocinas presentes y las señales contribuidas por la interacción entre las moléculas llamadas accesorias o co-estimuladoras y sus co-receptores/ligandos, las cuales pueden ser estimuladoras o inhibitorias (Fig. 2) (Gutcher and Becher 2007).



**Figura 2. Los linfocitos T requieren de tres señales para una activación y diferenciación óptima.** La primera señal es proporcionada a través de los péptidos cargados en el contexto del MHC-II por APCs, mientras que la segunda y tercera señal pueden provenir de la misma APC o de otras células circundantes. La segunda señal proviene de la interacción de los receptores co-estimuladores presentes en la superficie de los linfocitos T con sus respectivos co-receptores o ligandos, puede sinergizar o antagonizar las proporcionadas por el TCR. La última señal proviene de las citocinas presentes en el medio circundante al linfocito T. La naturaleza de la segunda y tercera señal serán determinantes para la diferenciación y polarización del linfocito T, en conjunto con las señales del TCR. Imagen modificada de Gutcher and Becher 2007

La naturaleza y balance de las citocinas, así como las señales de los co-receptores determinarán el tipo de funciones efectoras de los linfocitos T sobre otras células de la respuesta inmune. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tienen un papel esencial, pero están respaldadas por otros subtipos de células T, como las células T CD8<sup>+</sup>, las células  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup> y las células T CD1-restringidas.

En función de las señales percibidas, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse en linfocitos T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 o T<sub>H</sub>17. En presencia de IL-12, se diferencian en linfocitos T<sub>H</sub>1, siendo los principales productores de IFN- $\gamma$ , una citocina que potencia la actividad microbicida, la presentación de antígenos, aumento en la expresión de receptores co-estimuladores y de moléculas MHC-II y promueve la autofagia en macrófagos infectados (Gutierrez *et al.* 2004, O'Garra *et al.* 2013). Además, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> poseen la capacidad de inducir apoptosis en macrófagos infectados, a través de la secreción de granzimas, perforina y TNF. Asimismo la expresión de FasL (Boom *et al.* 2003), potencia la actividad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Green *et al.* 2013). Diversos estudios en modelos animales y humanos han mostrado que la deficiencia en IL-12 o IFN- $\gamma$  o en sus respectivos receptores, da lugar a una mayor susceptibilidad a infecciones por Mtb y a una mayor severidad de la enfermedad, que rápidamente lleva a la muerte (Cooper *et al.* 1993, Flynn *et al.* 1993, Caragol *et al.* 2003, Dorman *et al.* 2004, Boisson-Dupuis *et al.* 2011).

A través de la secreción de IL-17A, los linfocitos T<sub>H</sub>17 contribuyen al reclutamiento temprano y protector de células productoras de IFN- $\gamma$  hacia el pulmón, debido al aumento de las quimiocinas CXCL9, -10 y -11 (Khader *et al.* 2007). Asimismo, IL-17A es requerido para la formación y mantenimiento de los granulomas en ratones infectados por el bacilo Calmette-Guerin (BCG) o Mtb (Okamoto Yoshida *et al.* 2010). Además, esta citocina participa en la inducción de una respuesta T<sub>H</sub>1 óptima (Khader *et al.* 2007, Umemura *et al.* 2007). No obstante, los linfocitos T<sub>H</sub>17 contribuyen a la inmuno-patogenia del pulmón infectado por Mtb, favoreciendo la supervivencia y reclutamiento de neutrófilos y granulocitos al tejido pulmonar (Cruz *et al.* 2006, Cruz *et al.* 2010, Redford *et al.* 2010, Nandi and Behar 2011). En particular, los neutrófilos provocan inflamación en el tejido debido a la secreción de

proteínas remodeladoras de la matriz extracelular como elastasas, coleganasas y mieloperoxidasas (O'Garra *et al.* 2013).

Los linfocitos T<sub>H2</sub> antagonizan las respuestas inducidas por linfocitos T<sub>H1</sub> y T<sub>H17</sub> mediante la secreción de IL-4, IL-10, IL-13 y TGF-β (Harris *et al.* 2007). Estas citocinas disminuyen la capacidad de presentación de antígeno de las APCs y regulan a la baja la expresión de IL-2 e IL-2Rα (CD25), de tal forma que afectan la proliferación de los otros subtipos de linfocitos T (Rojas *et al.* 1999). Algunos estudios han mostrado que altas dosis de Mtb y co-infecciones con helmintos dan lugar a respuestas T<sub>H2</sub>, favoreciendo la progresión de la enfermedad (Hernandez-Pando *et al.* 1997, Power *et al.* 1998, Resende Co *et al.* 2007, Babu *et al.* 2009).

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> también participan en el control de la infección por Mtb. Aunque los linfocitos T CD8<sup>+</sup> producen cantidades reducidas de IFN-γ durante la infección por Mtb en ausencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, en presencia de estos, la producción de IFN-γ aumenta (Bold and Ernst 2012). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes con tuberculosis activa producen IL-17. También se han descrito linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de citocinas reguladoras como IL-10 y TGF-β, cuya expresión se ve aumentada en tuberculosis en proporción con la cantidad de bacilos encontrados en el esputo de estos pacientes (Silva *et al.* 2014). Por otra parte, en pacientes con tuberculosis la expresión de granzima A y B aumentan, tanto intra- como extra-celularmente (Garcia-Laorden *et al.* 2015), y por el contrario, la expresión de perforina se ve disminuida (Jiang *et al.* 2017). En modelos murinos, se demostró que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> emplean distintos mecanismos de citotoxicidad para eliminar las células infectadas por Mtb, entre los cuales figuran (en orden jerárquico) la liberación de perforina, la vía Fas-FasL y los receptores de TNF (TNFR, por sus siglas en inglés) (Woodworth *et al.* 2008). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes con tuberculosis pulmonar activa presentan una mayor actividad citotóxica y se encuentran en proporciones importantes en sangre periférica (Chavez-Galan *et al.* 2019).

A diferencia de los linfocitos T CD4 y CD8<sup>+</sup> convencionales, los linfocitos T γδ reconocen antígenos no peptídicos. Los linfocitos T γδ son una de las poblaciones innatas que responden temprano a la infección por Mtb (Vorkas *et al.* 2018). En el

pulmón, estas células reconocen antígenos fosforilados o isoprenoides, sin restricción por moléculas del MHC, funcionan como APCs y presentan una gran plasticidad, puesto que pueden producir IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF, e IL-10 en respuesta a antígenos de Mtb (Constant *et al.* 1994, Tanaka *et al.* 1995, Pinheiro *et al.* 2012, Coulter *et al.* 2017). Los linfocitos T  $\gamma\delta$  controlan o limitan el crecimiento de Mtb indirectamente, debido a la producción de GM-CSF, la cual activa a los macrófagos a través de la expresión de PPAR $\gamma$  (Rothchild *et al.* 2017). Los linfocitos T  $\gamma\delta$  también presentan actividad citotóxica contra células infectadas por Mtb mediante la interacción Fas-FasL, secreción de granzimas (B o M) o perforina (Jin *et al.* 2018).

Además de los numerosos estudios clínicos y modelos experimentales en los que se ha estudiado el papel de los linfocitos T en tuberculosis, la relevancia de la función de los linfocitos T ha sido puesta en evidencia en los casos de linfopenia idiopática u ocasionada por el VIH, que da lugar a una mayor susceptibilidad a Mtb y a una mayor severidad de la enfermedad y mortalidad (Socio *et al.* 1999, Corbett *et al.* 2003). En conjunto, las diferentes subpoblaciones de linfocitos T participan de manera importante en el establecimiento de mecanismos para detener la infección por Mtb.

### **Papel de las moléculas co-receptoras en la activación de linfocitos T en el contexto de la infección por Mtb.**

Si bien el reconocimiento de antígenos por el TCR es la llave maestra para desencadenar la activación de los linfocitos T, las células requieren de información adicional proporcionada por distintas moléculas co-receptoras algunas de las cuales, como CD28 y CD43, se expresan de manera constitutiva, mientras que la expresión de otras, como CD69, CD40L, CD25, OX40 o PD-1 depende de la activación previa de los linfocitos T.

## CD28

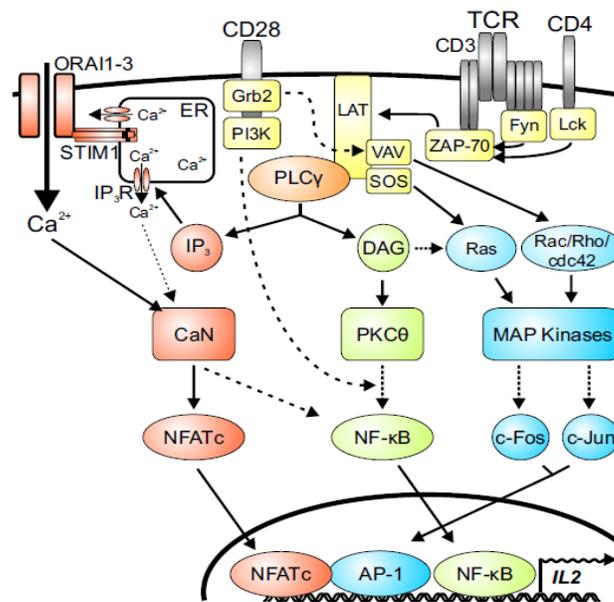
Actualmente se considera que la vía de señalización CD28/B7 es la vía dominante para la activación total y eficiente de los linfocitos T, aunque no es la única.

CD28 es un receptor perteneciente a la superfamilia de receptores de inmunoglobulinas, expresado constitutivamente en la superficie de los linfocitos T (Acuto and Michel 2003). La interacción de CD28 con sus ligandos CD80 y CD86, expresados en la superficie de APCs, complementa las señales provistas por el TCR (Sharpe and Freeman 2002), potenciando la proliferación de los linfocitos T, proveyendo señales anti-apoptóticas, regulando la diferenciación de los linfocitos T (regula la expresión de citocinas  $T_H1$  (IL-2, TNF e IFN- $\gamma$ ) y  $T_H2$  (IL-4)) (McAdam *et al.* 1998), y la expresión de otros co-receptores como CD25, OX40 y CD40L, también llamados marcadores de activación (Acuto and Michel 2003). Asimismo, regulan la respuesta humoral (cambio de isotipo, y formación de centros germinales) (Ferguson *et al.* 1996, Borriello *et al.* 1997).

CD28 amplifica las señales del TCR debido a que múltiples moléculas río abajo de su vía de señalización convergen con las señales inducidas por el TCR (**Fig. 3**). La unión de CD28 con sus ligandos (CD80/CD86), provoca cambios conformacionales en CD28 que favorecen su fosforilación por la actividad de Lck y Fyn. A continuación, se reclutan la cinasa de lípidos PI3K y la molécula adaptadora Grb2 al sitio fosforilado a través de sus dominios SH2. PI3K fosforila el fosfatidil-inositol (3, 4)-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para dar lugar a fosfatidil-inositol (3, 4, 5)-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Por otra parte, PIP<sub>2</sub> puede ser procesado por PLC- $\gamma$ , generando inositol-1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> se asocia a su receptor en el retículo endoplásmico e induce la liberación de calcio, favoreciendo la activación de la fosfatasa calcineurina, la cual remueve un grupo fosfato en NFAT, permitiéndole acceder al núcleo para promover la transcripción de genes. DAG por su parte activa a PKC- $\theta$  y el resultado final de la activación de esta cinasa es permitir el acceso de NF- $\kappa$ B al núcleo. Por su parte, Grb2 se asocia a los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF, por sus siglas en inglés) Vav1 y SOS, los cuales activan las pequeñas GTPasas Rac1, cdc42 y Ras. En conjunto

Ras, Rac1 y cdc42 activan la vía de MAPK y por último, permiten la activación de c-Jun que se asociará a c-Fos, lo cual da lugar al complejo de transcripción AP-1 (Riha and Rudd 2010). Los ratones deficientes en CD28 o sus ligandos presentan una respuesta inmune comprometida contra patógenos (King *et al.* 1996, Mittrucker *et al.* 2001, Compton and Farrell 2002), asma (Krinzman *et al.* 1996) y enfermedad de hospedero contra injerto (GVHD, por sus siglas en inglés) (Via *et al.* 1996), etc.

En el contexto de la infección por Mtb, los pacientes con tuberculosis activa presentan linfopenia en células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y además, tienen una marcada disminución en la expresión de CD28 (Bernal-Fernandez *et al.* 2010) y de su ligando CD86 (Flores-Batista *et al.* 2007). Recapitulando la enfermedad humana, en modelos murinos la interacción de CD28-CD80/CD86 es determinante para el control de Mtb en la etapa crónica de la infección, dado que los granulomas nascentes no maduran por completo y existe una menor infiltración de linfocitos T.(Bhatt *et al.* 2009).



**Figura 3. La señalización de CD28 sinergiza con la del TCR.** La activación del TCR, induce la activación de las cinasas Fyn y Lck, las cuales fosforilan a LAT, el cual funciona como un andamiaje molecular. Al mismo tiempo, la activación de CD28 induce el reclutamiento de Grb2 y PI3K, los cuales activan moléculas que convergen con la vía de señalización inducida por el TCR. De hecho, Grb2 interactúa con Vav1 y SOS que son reclutadas a LAT por el TCR. El resultado final es la activación de tres factores de transcripción clave: NFAT, NF-κB y AP-1. Imagen tomada de (Sieber and Baumgrass 2009)

## CD43

También conocida como sialoforina o leucosialina, CD43 es una sialoglicoproteína transmembranal expresada por células de origen hematopoyético, exceptuando eritrocitos y linfocitos B en reposo (Remold-O'Donnell *et al.* 1987). Como CD28, CD43 es otra molécula co-estimuladora que aporta señales a los linfocitos T durante la activación CD43 es otra molécula co-estimuladora que aporta señales a los linfocitos T durante la activación (rev. en Torres-Huerta *et al.* 2018)

### Estructura

En humanos, esta glicoproteína es codificada por el gen SPN localizado en el cromosoma 16 (Pallant *et al.* 1989). Estructuralmente, posee una región extracelular de 239 residuos de aminoácidos con alto contenido en serinas y treoninas, altamente glicosilada (O-glicosilación) y que se extiende alrededor de 45 nm fuera de la célula, una región transmembranal de 23 residuos de aminoácidos y una región intracelular de 123 residuos de aminoácidos con diferentes motivos que le permiten participar en vías de señalización (Torres-Huerta *et al.* 2018). Se han identificado dos tipos de glicofomas de CD43 que difieren en el patrón de glicosilación: una glicofoma de 115 kDa compuesta casi en totalidad por el tetrasacárido NeuAc( $\alpha$ 2-3)-Gal( $\beta$ 1-3)[(NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc y que es expresada principalmente en timocitos, linfocitos T CD4<sup>+</sup> en reposo y monocitos y una glicofoma 130 kDa compuesta por el hexasacárido NeuAc( $\alpha$ 2-3)-Gal( $\beta$ 1-3)[(NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc presente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, neutrófilos, linfocitos CD8<sup>+</sup>, macrófagos, plaquetas y linfocitos B (Fukuda 2002).

### Función/señales

Se han identificado un elevado número de ligandos de CD43 (**Tabla 1**), por lo que se considera una proteína multifuncional, que participa en múltiples procesos

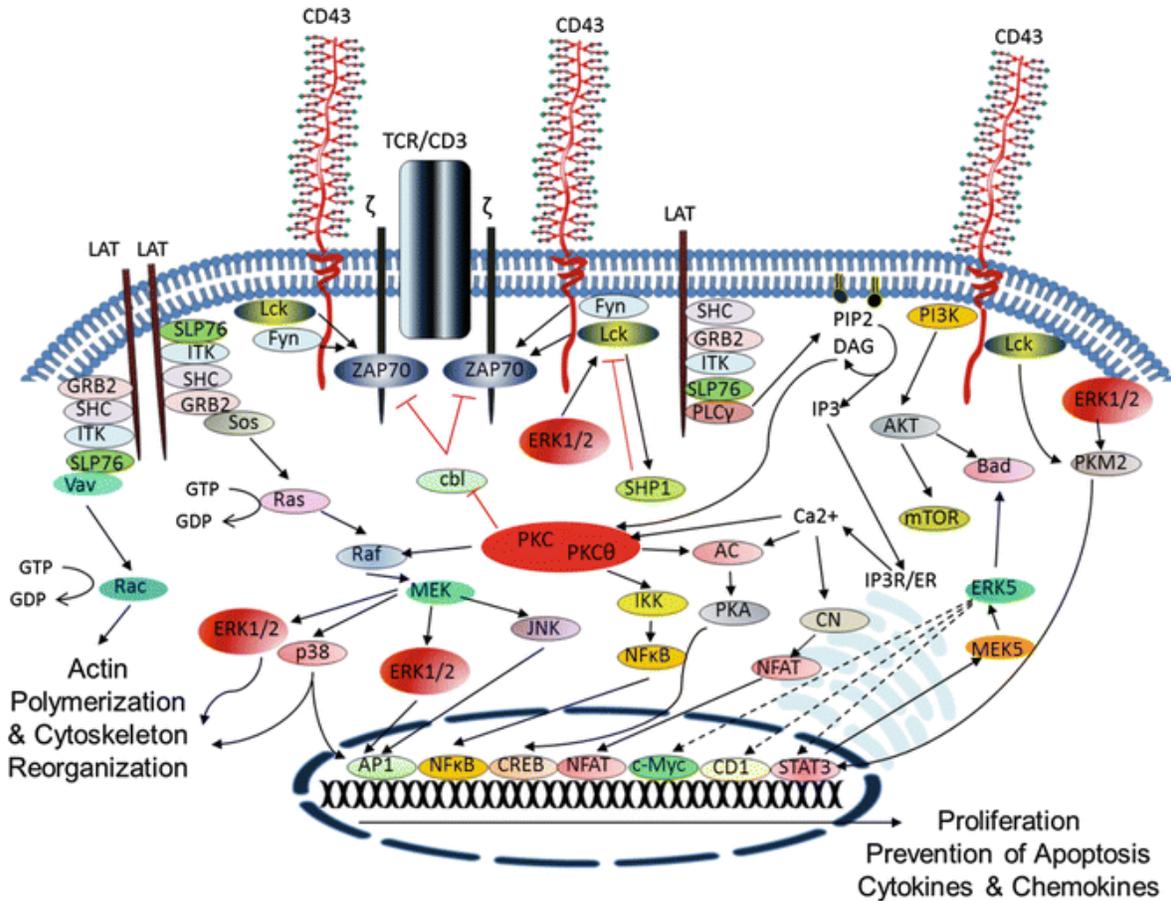
celulares, entre los cuales figuran: regulación de la adhesión, migración, activación y diferenciación de las células que lo expresan.

Ligandos	Reconocimiento	Tipo celular	Referencias
ICAM-1	Fisiológico	Linfocitos T	(Rosenstein <i>et al.</i> 1991)
MHC-I		Linfocitos T	(Stockl <i>et al.</i> 1996)
LFA-1		Linfocitos T, monoblastos	(Khunkaewla <i>et al.</i> 2008)
E-selectina		Linfoblastos T, leucemia BCP-NALL y linfocitos T <sub>H</sub> 17	(Matsumoto <i>et al.</i> 2005, Nonomura <i>et al.</i> 2008, Velazquez <i>et al.</i> 2016)
Siglec-1		Linfocitos T, células COS/CHO transfectadas	(van den Berg <i>et al.</i> 2001)
Albúmina sérica humana		Neutrófilos	(Nathan <i>et al.</i> 1993)
Galectina-1		Linfoblastos T y DCs	(Hernandez <i>et al.</i> 2006, Fulcher <i>et al.</i> 2009)
Nucleolina		Linfoma T	(Miki <i>et al.</i> 2009, Miki <i>et al.</i> 2013)
Hemaglutinina (Influenza A)	Patológico (infecciones)	Neutrófilos	(Hartshorn <i>et al.</i> 1995)
Cpn60.2 (Mtb)		Macrófagos	(Hickey <i>et al.</i> 2010)
HSA ( <i>S. gordonii</i> )		Neutrófilos	(Ruhl <i>et al.</i> 2000)
Trans-sialidasa ( <i>T. cruzi</i> )		Linfocitos T CD8 <sup>+</sup>	(Freire-de-Lima <i>et al.</i> 2010)
LT ( <i>E. coli</i> enterotoxigénica)		Enterocitos	(Zemelman <i>et al.</i> 1989)

**Tabla 1. CD43 y sus ligandos.** La tabla muestra los ligandos conocidos para CD43 y los tipos celulares en donde se identificaron las interacciones.

El entrecruzamiento de CD43 en la superficie de linfocitos T desencadena una serie de eventos de señalización intracelular que llevan a la activación de AP-1, NF- $\kappa$ B y NFAT, permitiendo que las células produzcan citocinas tales como IL-2, un factor de crecimiento indispensable para la proliferación de linfocitos (Santana *et al.* 2000). Además de regular el umbral de activación de los linfocitos T inhibiendo la actividad ubiquitin ligasa de c-Cbl (Pedraza-Alva *et al.* 2011), las señales de CD43 refuerzan las señales del TCR al inhibir la asociación de SHP-1 a Lck, lo cual se traduce en una fosforilación más prolongada de Lck y un refuerzo en las señales río abajo, resultando en una mayor activación de las MAPKs (en particular ERK 1/2 y ERK5) (Fierro *et al.* 2006, Bravo-Adame *et al.* 2017). Además, la estimulación CD43 + TCR da lugar a señales de supervivencia en linfocitos T a través de la función no glicolítica de la isoforma M2 de la piruvato cinasa (PKM2)

(Bravo-Adame *et al.* 2017) (**Fig. 4**). Así, las señales de CD43 combinadas con las del TCR llevan a una respuesta robusta.



**Figura 4. Vía de señalización de CD43.** El entrecruzamiento de CD43 promueve el reclutamiento y activación de las cinasas Fyn y Lck, y simultáneamente inhibe la función de SHP-1 y c-Cbl resultando en la disminución del umbral de activación y una mayor activación de los linfocitos T, y al igual que CD28, las señales de CD43 paralelizan y sinergizan con las señales derivadas del TCR. En consecuencia se activan los factores de transcripción NF-κB, NFAT y AP-1, resultando en la regulación de la proliferación, regulación del citoesqueleto de actina, la producción de citocinas y quimiocinas, así como la regulación de apoptosis por las funciones no glicolíticas de PKM2. Imagen tomada de (Torres-Huerta *et al.* 2018)

La señalización a través de CD43 junto con la del TCR promueve la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes a linfocitos T<sub>H</sub>1, lo cual se ve reflejado por el aumento en la expresión de T-bet, IFN-γ, las cadenas de alta afinidad de IFN-γR e IL-2R (CD25) y la co-localización de IFN-γR - TCR y TCR - IL-2R en un punto de la superficie celular facilitan la activación de estas células (Ramirez-Pliego *et al.* 2007, Cannon *et al.* 2008, Galindo-Albarran *et al.* 2014). En concordancia con lo

anterior, y con que en ratones CD43<sup>-/-</sup> los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tienden a diferenciarse a T<sub>H</sub>2, CD43 inhibe la expresión de GATA-3. (Ramirez-Pliego *et al.* 2007, Cannon *et al.* 2008, Galindo-Albarran *et al.* 2014).

Además de participar directamente en la activación de las células que lo expresan, la interacción entre CD43 y E-selectina permite el reclutamiento de los linfocitos T<sub>H</sub>17 y T<sub>H</sub>1 durante la inflamación (Matsumoto *et al.* 2005, Alcaide *et al.* 2007, Matsumoto *et al.* 2007). Recientemente, se describió que en los linfocitos T<sub>H</sub>17, CD43 favorece el rodamiento de los linfocitos sobre el endotelio vascular, un proceso independiente de PSGL-1 (una glicoproteína de membrana ligando de P-Selectina 1, por sus siglas en inglés) (Velazquez *et al.* 2016).

Por su capacidad de reconocer diferentes PAMPs, se ha propuesto que CD43 es un PRR (Torres-Huerta, *et al.* 2018). Fratazzi y colaboradores mostraron que diferentes micobacterias (*M. avium*, *M. bovis* y Mtb) emplean la porción extracelular de CD43 para asociarse a macrófagos murinos e incluso células HeLa transfectadas con CD43. Asimismo, observaron que *M. avium* induce la producción de altas concentraciones de TNF en macrófagos murinos con expresión normal de CD43 en comparación a los deficientes para CD43. Finalmente, estos autores mostraron que la falta de respuesta de las células CD43<sup>-/-</sup> respecto a la asociación de las micobacterias o la producción de TNF, era rescatada en presencia de galactogliproteína (la porción extracelular de la mucina CD43) (Fratazzi *et al.* 2000). Poco tiempo después, lo observado por Fratazzi y colaboradores fue expandido por Randhawa y colaboradores. Ellos observaron que, aunque distintas poblaciones de macrófagos murinos (MΦ residentes, macrófagos derivados de médula ósea, macrófagos de bazo y macrófagos peritoneales) expresan niveles variables de CD43, la ausencia de esta molécula afecta su capacidad para asociarse a micobacterias, pero no a otras bacterias. Por otra parte, mediante modelos de infección *in vitro* e *in vivo*, mostraron que los macrófagos y ratones CD43<sup>-/-</sup> controlan pobremente el crecimiento de Mtb por lo que durante la fase aguda y crónica de la infección hay un mayor daño en los pulmones de los ratones CD43<sup>-/-</sup> (Randhawa *et al.* 2005). Posteriormente, mostraron que los macrófagos CD43<sup>-/-</sup> infectados por Mtb producen menores

cantidades de IL12p40, IL-6 y TNF que los macrófagos WT. Además, observaron que los macrófagos CD43<sup>-/-</sup> infectados por Mtb mueren mayoritariamente por necrosis, mientras que los macrófagos WT por apoptosis, pero que si adicionaban IFN- $\gamma$  al cultivo de macrófagos CD43<sup>-/-</sup> recuperaban la capacidad para controlar el crecimiento de Mtb, y las células morían más por apoptosis, concluyendo los autores que el efecto observado es dependiente de las funciones pro-apoptóticas de TNF y que la deficiencia de TNF resultante de la falta de CD43, provoca un aumento en el crecimiento de Mtb y muerte celular por necrosis (Randhawa *et al.* 2008). En el año 2010, se encontró que CD43 interactúa con dos chaperoninas de la cápsula de Mtb, específicamente con Cpn60.2 (principalmente) y DNAK. Mediante ensayos de competencia se determinó que Cpn60.2 es la encargada de mediar la interacción entre macrófagos y Mtb a través de CD43 (Hickey *et al.* 2010). Además de las evidencias experimentales, en la población vietnamita se identificaron tres polimorfismos en el gen de CD43 asociados con la susceptibilidad a infección por Mtb y uno de ellos también está relacionado con la mortalidad (Campo *et al.* 2015).

Con base en la gran cantidad de evidencia de que CD43 es una molécula importante en la respuesta inmune frente a la infección contra tuberculosis, nuestro grupo evaluó el efecto de la interacción entre CD43 y Cpn60.2 en macrófagos humanos y murinos. Células deficientes en CD43 o con niveles reducidos de CD43 se estimularon con Cpn60.2, observándose que la producción de TNF en respuesta a la estimulación con Cpn60.2 es dependiente de CD43, ya que la producción de TNF se veía comprometida en aquellas células con expresión reducida o nula de CD43, tanto en macrófagos humanos como murinos. Mediante el uso de inhibidores específicos, se caracterizaron algunas de las moléculas río abajo de la vía de señalización de CD43. Particularmente las cinasas de la familia Src, PLC- $\gamma$ , PI3K, p38 y JNK, son responsables de la señalización que conduce a la producción de TNF en respuesta a la estimulación con la chaperonina Cpn60.2, en macrófagos humanos y murinos (Torres-Huerta *et al.* 2017).

Las evidencias anteriormente descritas son la base para este proyecto, aunado al papel de los linfocitos T frente a Mtb y la capacidad de Cpn60.2 para inducir la secreción de citocinas inflamatorias, en este proyecto nos enfocamos a evaluar el efecto que tiene la interacción CD43-Cpn60.2 en linfocitos T.

## **CD69**

Es una proteína anclada a membrana, perteneciente a la familia de receptores de lectina. Está compuesta por dos subunidades unidas por un enlace disulfuro en la región extracelular y ambas subunidades poseen un dominio de lectina tipo C, presenta un dominio transmembranal y una cola citoplasmática (Gorabi *et al.* 2020). La interacción de CD69 con sus ligandos (el receptor 1 de esfingosina 1-fosfato (S1P<sub>1</sub>, por sus siglas en inglés), galectina-1 (Gal-1) y el complejo S100A8/SA1009) resulta en el reclutamiento y activación de JAK3, la cual fosforila a STAT5, promoviendo su homo-dimerización, su acceso al núcleo y favorece la transcripción de sus genes diana (Martin *et al.* 2010).

CD69 se expresa en células NK, plaquetas, linfocitos T de memoria, células inmunes residentes de tejido, linfocitos T  $\gamma\delta$ , Treg y linfocitos T activados (Gonzalez-Amaro *et al.* 2013, Gorabi *et al.* 2020). Su expresión está regulada por los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 (Lopez-Cabrera *et al.* 1995, Castellanos *et al.* 1997) y es inducida por el entrecruzamiento de CD3/TCR, algunas citocinas como interferones del tipo I y ésteres de forbol (Yu *et al.* 2018). CD69 se considera como una molécula de activación temprana de los linfocitos T debido a su rápida expresión posterior a la estimulación (Gonzalez-Amaro *et al.* 2013). Sin embargo, también participa de manera importante en el moldeamiento de las respuestas inmunológicas. En este sentido, CD69 regula el egreso de los linfocitos T del timo y órganos linfáticos secundarios (Shiow *et al.* 2006, Mackay *et al.* 2015) a través de su asociación con S1P<sub>1</sub> impidiendo su activación mediada por S1P, debido a que CD69 promueve la internalización y degradación de S1P<sub>1</sub> (Bankovich *et al.* 2010). Al bloquear la señalización de S1P<sub>1</sub>, CD69, inhibe la activación de mTORC/HIF-1 $\alpha$  y JAK2/STAT3, lo que previene la diferenciación de

los linfocitos  $T_H1/T_H17$  y favorece la diferenciación de los linfocitos T hacia Treg. (Martin *et al.* 2010). Por otra parte, la interacción de CD69 con el complejo S100A8/S100A9 aumenta la expresión de SOCS3, lo cual inhibe la activación de STAT3 y promueve la diferenciación hacia Tregs (Lin *et al.* 2015). La interacción entre Gal-1 y CD69 inhibe la diferenciación de los linfocitos  $T_H17$  y la deficiencia sistémica de Gal-1 exacerba las respuestas  $T_H1/T_H17$  (Toscano *et al.* 2007, de la Fuente *et al.* 2014).

La deficiencia de CD69 o la interferencia en su actividad (por el uso de anticuerpos bloqueadores), ha permitido identificar el potencial de CD69 como una molécula moduladora de la severidad de enfermedades inflamatorias en múltiples modelos murinos, por ejemplo en artritis (Sancho *et al.* 2003), asma e hipersensibilidad (Martin *et al.* 2010), miocarditis (Cruz-Adalia *et al.* 2010), la eliminación de patógenos como *Listeria monocytogenes* (Vega-Ramos *et al.* 2010), respuestas anti-tumorales (Esplugues *et al.* 2003) y enfermedad inflamatoria de intestino (Radulovic *et al.* 2012, Hasegawa *et al.* 2013, Radulovic *et al.* 2013). En general, en estos modelos, CD69 regula la producción de citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF, IL-17A, IFN- $\gamma$ ; IL-21 e IL-22 y quimiocinas como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, CCL-1, CXCL-10 y CCL-19. El efecto supresor es mediado por la expresión de IL-10, TGF- $\beta$  (1-3) y la expresión de marcadores inhibitorios como CTLA-4, ICOS, CD38 y GITR. Siendo que las células Treg que expresan CD69 presentan un mayor potencial supresor que aquellas que no lo expresan, poniendo en perspectiva el potencial de CD69 como una molécula capaz de moldear las respuestas inmunológicas de acuerdo con las señales percibidas y el contexto en el que se encuentre expresada.

En el contexto de la infección por tuberculosis, recientemente se observó que aquellos individuos no infectados, pero en contacto cercano (CC) con individuos infectados presentan niveles de expresión de CD69 menores, tanto en linfocitos T CD4 $^+$  como en CD8 $^+$ . Además, cuando las células de estos individuos fueron estimuladas con péptidos de ESAT-6 y CFP10 para la producción de IFN- $\gamma$ , observaron que había un menor porcentaje de células CD4 $^+$  o CD8 $^+$ /IFN- $\gamma^+$ /CD69 $^+$  en CC en comparación a aquellos infectados (Chen *et al.* 2020), identificando así a

CD69 e IFN- $\gamma$  como potenciales marcadores para discriminar entre individuos sanos e individuos infectados pero no activos. En consistencia con lo anterior, la expresión de CD69 aumenta en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de fluidos pleurales de pacientes con pleurisma tuberculoso. A diferencia de las células negativas para CD69, estas células presentan un fenotipo efector o efector de memoria, respuestas tipo T<sub>H</sub>1 (las células expresan IL-2, TNF e IFN- $\gamma$  simultáneamente) y respuestas citotóxicas (Li *et al.* 2011, Li *et al.* 2014).

## **CD40L**

Es una glicoproteína anclada a membrana, perteneciente a la superfamilia de los TNFR, que forma homotrómeros. CD40L consta de una región intracelular corta, una región transmembranal pequeña y una región extracelular con un dominio tipo TNF (Karpusas *et al.* 1995). La expresión de esta molécula es inducible y se puede encontrar tanto en células de linaje hematopoyético (linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados, linfocitos B, células cebadas, basófilos, eosinófilos, células NK, monocitos, macrófagos, DCs, megacariocitos y plaquetas) como no hematopoyético (células de músculo liso, células endoteliales y epiteliales) (Gauchat *et al.* 1993, Gauchat *et al.* 1995, van Kooten and Banchereau 2000, Schonbeck and Libby 2001, Michel *et al.* 2017). CD40L tiene como ligandos a CD40 (Michel *et al.* 2017) y las integrinas Mac-1 (Zirlik *et al.* 2007, Wolf *et al.* 2011),  $\alpha 5\beta 1$  o VLA-5 (Leveille *et al.* 2007) y  $\alpha 11\beta 3$  (Andre *et al.* 2002). La interacción de CD40L con sus ligandos da lugar a la activación de la vía de MAPK y p38, así como la activación de NF- $\kappa$ B, exceptuando la interacción con Mac-1 que no parece inducir señalización río abajo (Michel *et al.* 2017), y cuya función biológica queda pendiente de entender.

Cuando CD40L interactúa con CD40 en linfocitos B, se favorece la formación de los centros germinales, el cambio de isotipo de inmunoglobulinas y la secreción de anticuerpos, la proliferación, la activación, así como la generación de células de memoria (Kawabe *et al.* 1994, Karnell *et al.* 2019) En linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD40L promueve su diferenciación hacia subtipos efectores. La interacción entre linfocitos

T CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> y DCs CD40<sup>+</sup> induce la producción de IL-12, citocina que polariza a los linfocitos hacia el subtipo T<sub>H</sub>1 (Kelsall *et al.* 1996). La expresión de CD40L les confiere a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> la capacidad de estimular a linfocitos B (proliferación y secreción de anticuerpos) y la de producir múltiples citocinas, como lo hacen las células T CD4<sup>+</sup>. (Frentsch *et al.* 2013). En DCs, la interacción CD40-CD40L incrementa los niveles de expresión de MHC-II, CD80, CD86, la producción de citocinas y quimiocinas, y las hace mejores presentadoras de antígeno (Ma and Clark 2009). En macrófagos, la interacción CD40-CD40L promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias, aumenta la producción de ROS (estallido respiratorio) y en presencia de citocinas T<sub>H</sub>1, los macrófagos presentan una actividad antitumoral potente (Suttles and Stout 2009, Luheshi *et al.* 2014). En células NK, la interacción de CD40 con CD40L aumenta su capacidad citotóxica, promueve su activación y proliferación (Carbone *et al.* 1997, Amakata *et al.* 2001, Terrazzano *et al.* 2004). En eosinófilos, aporta señales pro-vida e induce la secreción de GM-CSF (Ohkawara *et al.* 1996). En neutrófilos, CD40L y ROS inducen la activación de plaquetas (Vanichakarn *et al.* 2008). En células endoteliales (CD40<sup>+</sup>) la interacción con plaquetas (CD40L<sup>+</sup>), induce la producción y secreción de quimiocinas y moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento de leucocitos (Henn *et al.* 1998).

Asimismo, la interacción de CD40L (células endoteliales) con Mac-1 (leucocitos) durante el rodamiento leucocitario, provee un sitio de adhesión firme, lo cual favorece el reclutamiento de leucocitos a los sitios afectados (Wolf *et al.* 2011). La interacción CD40L (linfocitos T CD4<sup>+</sup>) y VLA-5 (fibroblastos bronquiales), induce la producción de IL-6 por parte de los linfocitos T (Loubaki *et al.* 2010). Por último, la interacción CD40L con la integrina αIIbβ3, participa en la formación de trombos y promueve la agregación plaquetaria (Andre *et al.* 2002).

En el contexto de la infección por tuberculosis, a través de la serin proteasa Hip1 asociada a la envoltura de Mtb, Mtb modula la maduración y activación de las DCs, reduciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias, la capacidad de presentación de antígeno y la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40 y CD86), de tal forma que se restringen las respuestas T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>17 (Madan-Lala *et*

al. 2014). La interacción entre CD40 (DCs) - CD40L (linfocitos T CD4<sup>+</sup>) es necesaria para la generación de respuestas T<sub>H</sub>17 frente a Mtb tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que mejora el control de la infección por Mtb (menor carga bacteriana) (Sia *et al.* 2017). Por otra parte, las células T CD4<sup>+</sup> de fluido pleural, de pacientes con pleurisma tuberculoso expresan CD40L tras estimularse con los péptidos de ESAT-6/CPF-10, y producen simultáneamente IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF, aunque también pueden producir IL-17 e IL-22, y presentan un fenotipo efector o efector de memoria (Li *et al.* 2011). En macrófagos, la activación de CD40 a través de CD40L en combinación con IFN- $\gamma$ , induce el proceso de autofagia y la expresión del receptor de vitamina D así como la producción de vitamina D bioactiva, la cual a su vez induce la producción de péptidos antimicrobianos como catelicidina, aumentando la actividad antimicrobiana de los macrófagos infectados (Klug-Micu *et al.* 2013).

En un modelo murino de infección por *Mycobacterium bovis*, los ratones deficientes en CD40L o IFN- $\gamma$  forman granulomas, pero a diferencia de los ratones deficientes en CD28, controlan mal el crecimiento de la micobacteria. En los granulomas, los ratones CD40L<sup>-/-</sup> secretan menos IFN- $\gamma$  que los ratones CD28<sup>-/-</sup> o WT (Hogan *et al.* 2001). Recapitulando esto mismo, en pacientes con tuberculosis, la alteración en la expresión de CD40L o la disrupción de la interacción entre CD40 y CD40L afecta la capacidad de producción de IFN- $\gamma$  de los linfocitos T así como la expresión de los receptores de IL-12 en linfocitos T (Samten *et al.* 2000). De la misma manera, en linfocitos T CD8<sup>+</sup> de individuos sanos estimulados con monocitos autólogos infectados por Mtb en presencia de trímero recombinante de CD40L, la producción de IFN- $\gamma$  y su capacidad citotóxica aumentan (mayor expresión de perforina y granulisina) (Samten *et al.* 2003). Por último, en la población China se identificaron SNPs de múltiples genes ligados al riesgo de padecer tuberculosis pulmonar, entre los cuales destaca CD40L (Hu *et al.* 2015). En conjunto estos datos resaltan la relación entre las señales dependientes de CD40L/CD40, la producción de IFN- $\gamma$  y el control de la infección.

## CD25

CD25 es también conocida como la subunidad  $\alpha$  del IL-2R (IL-2R $\alpha$ ). El receptor de IL-2 o IL-2R, puede existir en forma dimérica o trimérica. La forma dimérica está compuesta por las subunidades  $\gamma_c$  y  $\beta$ , y posee una baja afinidad por su ligando IL-2 ( $K_D \sim 10^{-9}$  M), mientras que la forma trimérica, de la cual CD25 forma parte, presenta una alta afinidad ( $K_D \sim 10^{-11}$  M) (Arenas-Ramirez *et al.* 2015). La expresión de CD25 en linfocitos T está regulada por la vía de señalización del TCR y también por la del IL-2R (Malek 2008). Esta molécula se expresa tanto en células inmunes como no inmunes, particularmente por: Treg (constitutivamente), linfocitos T activados, DCs, algunas líneas celulares de fibroblastos humanos y células endoteliales (Boyman and Sprent 2012).

De manera general, la función de CD25 es capturar IL-2 (Damoiseaux 2020), sin embargo, el contexto celular en que se expresa CD25 puede dar lugar a diferentes escenarios funcionales de los linfocitos T, específicamente, activación o supresión. En linfocitos T activados, CD25 aumenta la afinidad de IL-2R hacia IL-2 y en consecuencia, estos linfocitos proliferarán; en cambio, los linfocitos Treg emplean los altos niveles de CD25 para privar a las células efectoras de IL-2 y subsecuentemente la inducción de apoptosis por la privación de este factor de crecimiento (Pandiyani *et al.* 2007), como uno de los tantos mecanismos de supresión. Por otra parte, las células que no expresan la forma dimérica de IL-2R, como en el caso de las DCs (forma monomérica), CD25 tiene la capacidad de interactuar con IL-2, aunque con menor afinidad que la forma dimérica, y trans-presentar IL-2 a los linfocitos T con los cuales interactúan durante la sinapsis inmunológica (Wuest *et al.* 2011). Este proceso podría contribuir durante el cebado de las células T por las DCs, debido a que las células T vírgenes expresan bajos niveles de la forma dimérica de IL-2R.

CD25 puede ser procesado dando lugar a una forma soluble (sCD25) que se encuentra en el suero de individuos sanos y cuya concentración puede aumentar durante infecciones, enfermedades autoinmunes, inflamación y cáncer (Damoiseaux 2020). La liberación de sCD25 ocurre como respuesta a la activación

de los linfocitos T (Pedersen and Lauritsen 2009, Lindqvist *et al.* 2010), y la evidencia parece indicar que actúa como un sumidero, reduciendo la cantidad de IL-2 disponible, abatiendo la proliferación de linfocitos T efectores y posiblemente induciendo la apoptosis de los linfocitos (Brusko *et al.* 2009, Cabrera *et al.* 2010, Lindqvist *et al.* 2010).

En el contexto de tuberculosis, se ha propuesto el uso de sCD25 como marcador para diferenciar tuberculosis activa de la tuberculosis latente (Yao *et al.* 2017) o para diagnosticar tuberculosis (Eribo *et al.* 2020). Asociado a la expresión de CD25 en células Treg, se ha observado que la estimulación de linfocitos T de individuos negativos para la prueba de tuberculina generan células iTreg y que este fenómeno depende parcialmente de la expresión de TGF- $\beta$  e indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO, por sus siglas en inglés) por monocitos (Hirsch *et al.* 2016). En este mismo sentido, se ha reportado que las células Treg aumentan en pacientes con tuberculosis activa (Hougardy *et al.* 2007, Mahan *et al.* 2009) o latente (Herzmann *et al.* 2012), suprimiendo la proliferación de linfocitos TCR- $\alpha\beta^+$  y TCR- $\gamma\delta^+$ , y parcialmente, la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos TCR- $\gamma\delta^+$  (Hougardy *et al.* 2007, Mahan *et al.* 2009), identificándose las proteínas ESAT-6 y Ag85B de Mtb como parcialmente responsables de la expresión de FoxP3 y de la expansión de células Treg CD25 $^+$  (Wu *et al.* 2015). La presencia de Tregs restringe las funciones de los linfocitos T efectores y en consecuencia los macrófagos infectados no pueden controlar a la micobacteria (Semple *et al.* 2013), mientras que la depleción de los linfocitos Treg de pacientes con tuberculosis activa da lugar a un incremento en las respuestas inmunológicas (producción de IFN- $\gamma$ ) frente a la estimulación con antígenos de la micobacteria (Chiacchio *et al.* 2009).

En contraparte de lo anterior, recientemente se encontró una población de linfocitos T CD4 $^+$ CD25 $^+$ FoxP3 $^+$  apoptóticos, que contribuyen al control del crecimiento intracelular de Mtb en humanos y en ratones, mediante la producción del factor soluble inhibidor de disociación Rho GDP (D4GDI, un regulador negativo de la actividad de GTPasa de las pequeñas GTPasa de la familia Rho. La mayor cantidad de D4GDI se encuentra en el fluido pleural y hay mayor expresión en

pacientes con infección latente en comparación a los pacientes con enfermedad activa. En macrófagos infectados por Mtb, D4GD1 estimula la producción de IL-1 $\beta$ , TNF, G-CSF, ROS e incrementa la apoptosis de estos macrófagos, mientras que en Mtb induce la expresión de genes asociados a estado de latencia. Se ha sugerido que estos dos mecanismos son los responsables del control del crecimiento de Mtb (Venkatasubramanian *et al.* 2015).

## **OX40**

Es una glicoproteína transmembranal de tipo I, perteneciente a la superfamilia de los TNFR. Estructuralmente, presenta un dominio extracelular de unión a ligando compuesto por cuatro repeticiones de dominios ricos en cisteínas (CRDs, por sus siglas en inglés), un único dominio transmembranal y una cola citoplasmática capaz de señalizar (Willoughby *et al.* 2017). La expresión de esta molécula es inducible por estímulos como el reconocimiento de antígenos por el TCR y la coestimulación a través de CD28 (Rogers *et al.* 2001). La expresión de OX40 se encuentra restringida a células de origen hematopoyético (linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados, células NK, NKT y neutrófilos), mientras que su ligando (OX40L, igualmente inducible) se encuentra en APCs (DCs, linfocitos B activados y macrófagos), células NK activadas, mastocitos, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> responsivos, en células endoteliales y células de músculo liso (Fu *et al.* 2020). OX40 forma complejos de homotrímeros cuando interactúa con su ligando, lo cual provoca una cascada de señalización que culmina con la activación de NF- $\kappa$ B. Al activar la vía de PI3K/AKT y NFAT, las señales de OX40 sinergizan con las del TCR (Willoughby *et al.* 2017).

Respecto a las funciones, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> se ha observado que la expresión de OX40 y la señalización derivada de su interacción con su ligando (OX40L) se asocian a un incremento de la supervivencia por el aumento en la expresión de factores anti-apoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL (Rogers *et al.* 2001). Las señales de OX40 prolongan las respuestas de los linfocitos T (proliferación, activación y producción de citocinas) (Gramaglia *et al.* 1998) y, dependiendo del contexto,

pueden polarizar hacia diferentes subtipos de linfocitos T<sub>H</sub> (Webb *et al.* 2016). OX40 es importante para la generación y mantenimiento de células de memoria tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, siendo que la actividad antitumoral de estos últimos aumenta después del tratamiento con agonistas de OX40 (Gramaglia *et al.* 2000, Bansal-Pakala *et al.* 2004, Soroosh *et al.* 2007, Salek-Ardakani *et al.* 2008, Moran *et al.* 2013). En linfocitos B la interacción OX40/OX40L promueve su diferenciación a células plasmáticas y aumenta la producción de anticuerpos (Stuber *et al.* 1995, Stuber and Strober 1996).

En el contexto de la infección por tuberculosis, la vacunación de ratones con BCG en presencia de OX40-IgG (proteína de fusión) da lugar a una mayor protección a los ratones desafiados con la cepa H37Rv de Mtb, encontrándose una mayor cantidad de células infiltrantes en pulmón y bazo, una mayor producción de IFN- $\gamma$  *in situ*, una disminución de las CFUs y una mayor capacidad proliferativa de las células de bazo en respuesta a PPD, en comparación a las células de los ratones sin vacunar o vacunados con BCG (Snelgrove *et al.* 2012). Por último, la expresión de OX40 en conjunto con la expresión de CD69 o CD25 ha sido empleada para identificar respuestas de memoria frente a tuberculosis o bien para identificar casos de tuberculosis activa (Skoberne *et al.* 2000, Ubolyam *et al.* 2021).

## **PD-1**

Es una proteína transmembranal del tipo I, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Estructuralmente presenta un dominio extracelular de inmunoglobulina variable, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática que presenta un motivo de inmuno-receptor inhibitorio basado en tirosina (ITIM, por sus siglas en inglés) y un motivo de inmuno-receptor de cambio basado en tirosina (ITSM, por sus siglas en inglés). Su expresión se induce en respuesta a las señales del TCR, IFN tipo I, citocinas como IL-2, IL-21, IL-15, IL-7, IL-6 e IL-12 (Salmaninejad *et al.* 2019), siendo la transcripción del gen regulada por los factores de transcripción: NFAT, NOTCH, FOXO1 e IRF9 (Staron *et al.* 2014, Han *et al.* 2020). Se le puede encontrar expresada en la superficie de múltiples células

del sistema inmune activadas, por ejemplo: en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, linfocitos B, macrófagos, DCs, células NK y monocitos (Han *et al.* 2020).

PD-1 tiene dos ligandos: PD-L1 y PD-L2. PD-L1 se expresa constitutivamente en APCs, como DCs, macrófagos y linfocitos B, y linfocitos T (Francisco *et al.* 2010). Además, la expresión de PD-L1 es inducible en células endoteliales, células testiculares, células de la placenta (Francisco *et al.* 2010), así como diversos tipos de células tumorales (Garcia-Diaz *et al.* 2017). Por otra parte, PD-L2 se expresa en la superficie de APCs (macrófagos y DCs mieloides) y en células epiteliales del tracto respiratorio (Momtaz and Postow 2014). La interacción de PD-1 con sus ligandos, promueve la fosforilación del ITSM de su cola citoplasmática, esto a su vez permite el reclutamiento de la fosfatasa SHP2. A continuación, SHP2 a través de su actividad fosfatasa, remueve los fosfatos de Lck, inhibiéndola, de tal forma que finaliza la señalización del TCR. A la par SHP2, inhibe la función de PLC- $\gamma$  y PI3K, y promueve la activación de la fosfatasa PTEN, que se encarga de generar PIP2 a partir de PIP3 (Sheppard *et al.* 2004, Salmaninejad *et al.* 2019).

PD-1 limita las respuestas de linfocitos T efectoras para disminuir el potencial daño a tejidos frente a la estimulación persistente, además protege de enfermedades autoinmunes (Zhang *et al.* 2016). Asimismo, PD-1 participa en la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a Tregs y los protege de apoptosis (Asano *et al.* 2017). PD-1 también participa en el proceso conocido como agotamiento, el cual ocurre durante una exposición persistente a antígenos o bien durante una activación sub-óptima, en infecciones crónicas o cáncer. En ambos casos, la expresión de PD-1 aumenta (He *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2016), lo cual promueve la persistencia del patógeno o cáncer por la incapacidad de las células inmunes para montar las respuestas adecuadas.

Durante la infección por tuberculosis, diferentes poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (efectores, responsivos pero no Tregs) de individuos con tuberculosis activa presentan una mayor expresión de PD-1 y PD-L1 en comparación a individuos sanos, la cual disminuye en respuesta al tratamiento anti-tuberculosis (Shen *et al.* 2016). Como se mencionó anteriormente, Mtb induce la expansión de células Tregs, siendo esto en parte dependiente de la expresión de PD-1. Estas células,

funcionalmente supresoras, producen IL-10 y TGF- $\beta$  y afectan la producción de IFN- $\gamma$  de otros linfocitos T (Periasamy *et al.* 2011).

En un modelo *in vitro*, se observó que el bloqueo de la vía PD-1 (en linfocitos T CD8<sup>+</sup>)/PD-L1 (en células CD14<sup>+</sup>) aumenta la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> Mtb específicos hacia células CD14<sup>+</sup> de muestras de efusión pleural de pacientes con tuberculosis (Suarez *et al.* 2019). En otro modelo, empleando células provenientes del fluido pleural de pacientes con tuberculosis, se observó una mayor cantidad de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> expresando PD-1. Estas células PD-1<sup>+</sup> presentaban un fenotipo de memoria con capacidad para activarse y producir citocinas T<sub>H1</sub> y, en consistencia con otros estudios, el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 aumentaba el porcentaje de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ , resaltando el papel negativo de esta vía en el control de las respuestas efectoras de los linfocitos T (Li *et al.* 2019). La expresión de PD-1 correlaciona con la expresión elevada del factor de transcripción BAFT en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de sangre periférica en pacientes con tuberculosis activa, en comparación a individuos con infección latente o sanos. De acuerdo con lo anterior, la deficiencia de este factor de transcripción aumenta la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$  y la proliferación de células T CD4<sup>+</sup>, lo cual sugiere que BAFT podría ser el mediador del efecto negativo de la vía PD-1/PD-L1 sobre las funciones efectoras de células T (Liu *et al.* 2019)

### **Cpn60.2: un PAMP con funciones inmunomoduladoras?**

Como se mencionó anteriormente, CD43 puede ser un receptor de PAMPs. En este contexto, se ha reportado la interacción de CD43 con la hemaglutinina del virus de influenza A, con la adhesina HSA de *Streptococcus gordonii* (la bacteria causante de la endocarditis infecciosa), con la trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* y con la chaperonina de Mtb (**Tabla 1**).

Cpn60.2, también conocida como Hsp65 o GroEL2, es una chaperonina perteneciente a la familia de las proteínas de choque térmico “Hsp60”. Las chaperoninas de esta familia están altamente conservadas en procariontes y

eucariontes. Entre micobacterias, las Hsp65 presentan una homología >95% (Shinnick *et al.* 1987), mientras que entre Hsp65 de Mtb, *E. coli* y humanos (Hsp60) existe una homología de ~60 y 47%, respectivamente. Entre Cpn60.2 y Cpn60.1 de Mtb hay una homología del 61% (Kong *et al.* 1993).

Históricamente Cpn60.2 fue descubierto antes que Cpn60.1 (Kong *et al.* 1993) y fue uno de los primeros antígenos de Mtb estudiados, debido a que se observó que una gran proporción de los linfocitos T y B reactivos (tanto en humanos como en ratones) contra tuberculosis son Cpn60.2-específicos, es decir, Cpn60.2 es un antígeno inmunodominante (Engers *et al.* 1985, Kaufmann *et al.* 1987, Lamb *et al.* 1987), siendo la forma oligomérica mucho más inmunogénica que la monomérica (Naffin-Olivos *et al.* 2014). Mediante modelaje molecular y análisis de las estructuras de los cristales obtenidos de Cpn60.1 y Cpn60.2, se observó que ambas chaperoninas existen como oligómeros de bajo tamaño. Cpn60.2 puede formar tetrámeros o pentámeros, aunque también puede existir como monómero por actividad de Hip1 (Naffin-Olivos *et al.* 2014).

Cpn60.2 es una proteína esencial para el crecimiento y supervivencia de Mtb, demostrado por el hecho que las bacterias deficientes en Cpn60.2 no son viables (Hu *et al.* 2008, Vargas-Romero *et al.* 2016). A diferencia de Cpn60.2, Cpn60.1 es dispensable para el desarrollo de Mtb, aunque se vuelve necesaria en condiciones de hipoxia, al favorecer la expresión de genes de respuesta a hipoxia (Sharma *et al.* 2016). Cpn60.1 es también necesaria para la formación de MGCs (> a 5 núcleos). Además, es un potente inhibidor de la formación de osteoclastos murinos y de la reabsorción ósea, mientras que Cpn60.2 no (Cehovin *et al.* 2010).

Ambas chaperoninas pueden encontrarse dentro o en la superficie del bacilo (Hickey *et al.* 2009, Cehovin *et al.* 2010). En su forma intracelular, Cpn60.2 tiene como función principal el mantenimiento del plegamiento adecuado de proteínas y evitar la agregación de proteínas (Qamra *et al.* 2004). En condiciones de estrés, se exporta a la cápsula bacteriana, en donde funciona como adhesina, para una asociación eficiente entre macrófagos y micobacterias (Qamra *et al.* 2005, Hickey *et al.* 2009, Hickey *et al.* 2010).

Cuando se estimulan leucocitos totales de sangre con Cpn60.1 o Cpn60.2, se observa una mayor producción de IL-1 $\beta$  e IL-6 con Cpn60.2 y solo Cpn60.2 induce la producción de TNF (Cehovin *et al.* 2010). Sin embargo, cuando macrófagos purificados se estimulan con Cpn60.1 o Cpn60.2, Cpn60.1 es un estimulador de la producción de citocinas más potente que Cpn60.2, ya que se requiere de una menor concentración de Cpn60.1 para inducir una mayor producción de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF, IL-12, GM-CSF e IL-10) que lo observado con Cpn60.2 (Lewthwaite *et al.* 2001).

Las dos chaperoninas difieren en la vía de señalización. Cpn60.1 requiere primordialmente de la interacción con TLR4 y CD14 y parcialmente de la señalización a través de MyD88, mientras que Cpn60.2 requiere de la interacción con TLR4, parcialmente de TLR2 y solo parcialmente de la señalización a través de MyD88 y es independiente de CD14 (Lewthwaite *et al.* 2001, Cehovin *et al.* 2010). Además, de particular interés para este trabajo, Cpn60.2 emplea a CD43 como receptor e induce la producción de TNF en macrófagos (Hickey *et al.* 2010, Torres-Huerta *et al.* 2017).

Una vez que las micobacterias son fagocitadas por macrófagos, una forma monomérica de Cpn60.2 resultante de la actividad proteolítica de Hip1 (considerada como un factor de virulencia de Mtb) (Rengarajan *et al.* 2008), se escapa de los fagolisosomas por un mecanismo aún no ha descrito aunque, se ha observado que puede formar poros en membranas y alterar la permeabilidad de los fagolisosomas (Alder *et al.* 1990, Teitelbaum *et al.* 1999). Una vez fuera del fagolisosoma, Cpn60.2 interacciona con mortalina (Hsp70) en la mitocondria, lo cual inhibe la apoptosis de los macrófagos infectados. Los investigadores siguieron que el efecto observado se debe a que por su función de chaperona, Cpn60.2 incrementa la estabilidad de mortalina (Hsp70), y por ende la capacidad protectora de la apoptosis de mortalina. (Joseph *et al.* 2017).

Las evidencias referentes al reconocimiento de Cpn60.2 por CD43, y los reportes de la mayor susceptibilidad de los ratones CD43<sup>-/-</sup> a la infección por Mtb, aunado al papel de los linfocitos T frente a Mtb y la capacidad de Cpn60.2 para inducir la secreción de citocinas inflamatorias, son la base para este proyecto.

## **HIPÓTESIS**

La interacción CD43-Cpn60.2 en linfocitos T genera señales que modularán el estado de activación de los linfocitos T humanos, posiblemente contribuyendo a definir la evolución de la enfermedad.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Determinar si Cpn60.2 modula el estado de activación de los linfocitos T humanos (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>).

### **Particulares**

- 1) Evaluar la expresión de moléculas asociadas con el estado de activación de los linfocitos T en respuesta a la estimulación con Cpn60.2.
- 2) Definir el perfil de citocinas que resultan de la estimulación con Cpn60.2.

## **METODOLOGÍA**

### **Cultivo Celular**

El protocolo que se describe a continuación fue aprobado por el Comité de Bioética del IBt-UNAM. Los linfocitos T humanos fueron aislados de concentrados leucocitarios de sangre periférica de donadores sanos, proporcionados por el Banco de Sangre del Centro Estatal de Transfusión Sanguínea en Cuernavaca, Morelos, México. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron aisladas mediante centrifugación sobre un colchón de Ficoll. Posteriormente los linfocitos T totales fueron purificados por selección negativa con un kit de aislamiento de células T humanas (Miltenyi Biotec).

Una vez purificadas, y antes de activar, las células fueron ayunadas por 18-24 horas en medio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) suplementado con 2% suero [suero fetal bovino (FBS): suero de bovino recién nacido (NBS) 1:1], 100 U/mL de penicilina, estreptomina 50 µg/mL y glutamina 2 mM (PSG) y β-mercaptoetanol 50 mM, a 37°C y en un ambiente húmedo con 5% CO<sub>2</sub>. Durante la estimulación, las células fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementado con PSG y 10% suero (RPMI completo).

### **Evaluación de pureza**

Para determinar el enriquecimiento y la pureza de los linfocitos T, se realizaron tinciones de superficie celular dirigidas hacia CD3, CD43 y CD28. Se emplearon  $5 \times 10^5$  linfocitos T purificados para cada tinción. Las células se lavaron con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 316 g durante 7 minutos. El bloqueo de receptores Fc se llevó a cabo por incubación de las células con solución de FACS (PBS, con 2% de suero de ternera) suplementada con suero humano 20%, durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se agregaron los anticuerpos (**Tabla 2**) en 50 µL de solución de FACS y se incubaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Como control negativo de la tinción, se emplearon células sin teñir (ST). Al finalizar la incubación, se agregó 1 mL de PBS y se centrifugó a 316 g durante 7 minutos. Por

último, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 1% (concentración final) durante 15 minutos a T.A. Las muestras fueron procesadas en un citómetro de flujo BD FACSCanto II y analizadas con el software FlowJo VX para Windows. Se obtuvo el porcentaje de células positivas para cada marcador partiendo de la región de células únicas, así como los niveles de fluorescencia para cada marcador de cada uno de los donadores.

Anticuerpos	Marca	Clona	Especie e Isotipo	Concentración final o volumen final
$\alpha$ -hCD28-APC	TONBO	CD28.2	Ratón; IgG1	1.5 $\mu$ g/mL
$\alpha$ -hCD3-PE	Caltag	OKT3	Ratón; IgG2a	3 $\mu$ L/test
$\alpha$ -hCD43-FITC	Caltag	MEM59	Ratón; IgG1	10 $\mu$ L/test

**Tabla 2. Anticuerpos empleados para evaluar la pureza.**

### **Evaluación del estado de activación de los linfocitos T: marcadores de activación**

La proteína recombinante Cpn60.2 con etiqueta de 6X-histidinas (His-tag) de *Mtb* fue proporcionada por la Dra. Clara Espitia (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). La proteína se expresó heterológamente en la cepa Rosetta (DE3) de *E. coli* (Torres-Huerta *et al.* 2017). Previo a la activación celular, la proteína Cpn60.2 (60  $\mu$ g/experimento) se incubó con un exceso de perlas de sefarosa-polimixina B (100  $\mu$ L, de Thermo Scientific) durante 12 horas a 4°C en agitación constante, para remover las posibles trazas de LPS. A continuación, la mezcla se centrifugó a 17,982 g por 20 segundos y el sobrenadante (Cpn60.2) se guardó a 4°C hasta su uso. Todos los procedimientos se realizaron en la campana de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad.

Los linfocitos T purificados ( $5 \times 10^5$  células) de los donadores fueron ayunados como se describió anteriormente y estimulados por 24 y 72 horas con los anticuerpos: **OKT3 (anti-CD3e)**, **L10 (anti-CD43)**, **CD28.2 (anti-CD28)** y  **$\alpha$ -mIgG1** a 2  $\mu$ g/mL y **Cpn60.2** (0.25, 2.5 ó 25  $\mu$ g/mL). La proteína Cpn60.2 y los anticuerpos, excepto el anticuerpo anti-CD28 y su entrecruzador ( $\alpha$ -mIgG1), se

usaron pegados a pozos de placas de 48 pozos. Como control positivo se empleó un estímulo de PMA (20 ng/mL) + Ionomicina (1 µg/mL) y como control negativo las células se cultivaron en RPMI completo (condición US). El volumen final de reacción fue de 500 µL. Al término de la incubación, las células y el medio de cultivo se recolectaron y centrifugaron a 316 g por 7 minutos, el sobrenadante se guardó para cuantificar las concentraciones de citocinas secretadas y las células se procesaron para evaluar la expresión de marcadores de activación por citometría de flujo. Después de un lavado más con PBS (316 g, 7 minutos), las células se incubaron con la solución de bloqueo de receptores Fc como se describió en la evaluación de la pureza. A continuación, se agregaron los anticuerpos que se detallan en la **Tabla 3** para evaluar la expresión de marcadores asociados con el estado de activación.

Los anticuerpos se agregaron en un volumen de 50 µL y las células con los anticuerpos se incubaron 30 minutos a 4°C. Al término de la incubación, se agregaron 4 mL de PBS a cada tubo y se centrifugaron a 316 g durante 7 minutos y se fijaron con PFA 1% (concentración final). Las muestras fueron procesadas en un citómetro de flujo BD FACSCanto II y analizadas con el software FlowJo VX para Windows.

Del análisis se obtuvieron los porcentajes de positividad para cada marcador partiendo en las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y, de las células positivas para estos marcadores se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés). Además, se obtuvieron los histogramas de la expresión de cada marcador para cada subpoblación de linfocitos T.

Anticuerpos	Marca	Clona	Concentración Final
$\alpha$ -hOX40-PerCP/Cy5.5	BioLegend	ACT5	2.5 $\mu$ g/mL
$\alpha$ -hPD-1-Pacific Blue		EH12.2 H7	1.25 $\mu$ g/mL
$\alpha$ -hCD69-PE		FN50	0.25 $\mu$ g/mL
$\alpha$ -hCD40L-FITC		24-31	1 $\mu$ g/mL
$\alpha$ -hCD25-APC		BC96	1 $\mu$ g/mL
$\alpha$ -hCD4-APC/Cy7		OKT4	1 $\mu$ g/mL
$\alpha$ -hCD8-BV510		SK1	1 $\mu$ g/mL
$\alpha$ -hTLR2-AF647		TL2.1	2.5 $\mu$ g/mL
$\alpha$ -hTLR4-BV421		HTA125	2.5 $\mu$ g/mL

**Tabla 3. Anticuerpos para la tinción celular de marcadores de activación.**

Se calcularon los valores de intensidad media de fluorescencia integrados (iMFI, por sus siglas en inglés), los cuales resultan de la multiplicación de los porcentajes y el MFI. Los valores de iMFI se graficaron en GraphPad Prism 8.

### **Ensayo de Apoptosis (Viability Dye-Annexine V)**

Se evaluó la viabilidad de los linfocitos T recién purificados, así como 24 horas posteriores a la estimulación con Cpn60.2 en presencia o no de los estímulos TCR $\pm$ coestimuladores. Las células activadas se recolectaron en tubos para FACs y se centrifugaron a 316 g por 7 minutos. Después de decantar el sobrenadante, se agregaron 4 mL de PBS al botón celular y nuevamente se centrifugaron las células a 316 g por 7 minutos, se decantó nuevamente el sobrenadante. Después de resuspender suavemente el botón celular, cuidadosamente se agregaron 50  $\mu$ L de la solución stock (1:15,000) del colorante de viabilidad 780 (Viability Dye 780, de BioLegend) para una concentración final de 1:30,000, considerando que las células están en un volumen de  $\sim$ 50  $\mu$ L, se mezcla cuidadosamente y se incuba por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Al finalizar la incubación se agregaron 4 mL de PBS al tubo y se centrifuga a 316 g por 7 minutos. Se decanta el sobrenadante y las células se resuspenden en 100  $\mu$ L de buffer de unión de anexina (BUA, 10 mM HEPES, 140 mM NaCl y 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.4), después se agrega 1.5  $\mu$ L de Anexina V-FITC (BD Pharmigen) y se incuba por 15 minutos a T.A. en oscuridad.

Al término de la incubación las muestras son lavadas con 1 mL de BUA, se decanta, se resuspenden las células y se fijan con PFA al 1% (concentración final). La adquisición de las muestras se llevó a cabo en el citómetro de flujo BD FACSCanto II y los datos fueron analizados con el software FlowJo VX para Windows.

### **Cuantificación de citocinas por Multiplex**

Los sobrenadantes de las células activadas como se describió anteriormente, fueron recolectados y procesados para cuantificar citocinas con el kit T<sub>h</sub> de LEGENDPlex (panel de 13 citocinas). Se siguieron las instrucciones del fabricante. Se agregaron 50 µL de Buffer de ensayo a cada tubo eppendorf, después se agregaron 25 µL de los sobrenadantes ó 25 µL de cada muestra estándar al tubo correspondiente y, por último, se agregan 12.5 µL de la mezcla de perlas y 12.5 µL de los anticuerpos de detección. A continuación, los tubos se protegen de la luz y se incuban por 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante de 1000 rpm. Posteriormente, a los 100 µL de las muestras o curva patrón se adicionan 12.5 µL de estreptavidina-PE, la cual reconoce los anticuerpos de detección biotinilados. Los tubos protegidos de la luz se incuban 30 minutos en agitación (1000 rpm), después de lo cual los tubos eppendorf se centrifugan a 2180 g por 5 minutos, se elimina el sobrenadante y las perlas se lavan dos veces con la solución de lavado (Wash Buffer 1X, 200 µL/tubo), centrifugando cada vez a 2180 g por 5 minutos. Para finalizar, las perlas se resuspenden en un volumen de 200 µL y la concentración de cada uno de los analitos se determina midiendo la fluorescencia (MFI) de las perlas correspondientes con el citómetro BD FACSCanto II. Los datos obtenidos se procesan usando el software provisto por el fabricante. Con los valores de MFI de la curva patrón de cada una de las citocinas del kit se obtiene la concentración de las citocinas problema, por extrapolación de sus respectivos valores de MFI.

El mapa de calor se generó con el software MeV 4.9, usando los datos arrojados por el software de BioLegend. La concentración promedio de cada citocina de la

condición US se restó a la concentración promedio de cada una de las citocinas, para todas las condiciones experimentales. Los datos se agruparon usando la opción de agrupación no supervisada por jerarquización, se seleccionaron las opciones de “árboles de genes y muestra”, además se optimizó el ordenamiento de hoja tanto para genes como para muestra. Como métrica de selección de distancia se empleó distancia Manhattan. A continuación, el mapa de calor se transforma usando  $\log_2$  y se actualiza la escala, de tal forma que permita visualizar las diferencias entre condiciones experimentales y citocinas.

### **Pruebas Estadísticas**

Se realizó la prueba de mixed-effects para evaluar la significancia intra-estímulo con diferentes concentraciones de Cpn60.2.

Se realizó la prueba de t-student pareada, paramétrica de dos colas para evaluar la significancia entre las condiciones control (sin Cpn60.2) y las condiciones problema (con Cpn60.2).

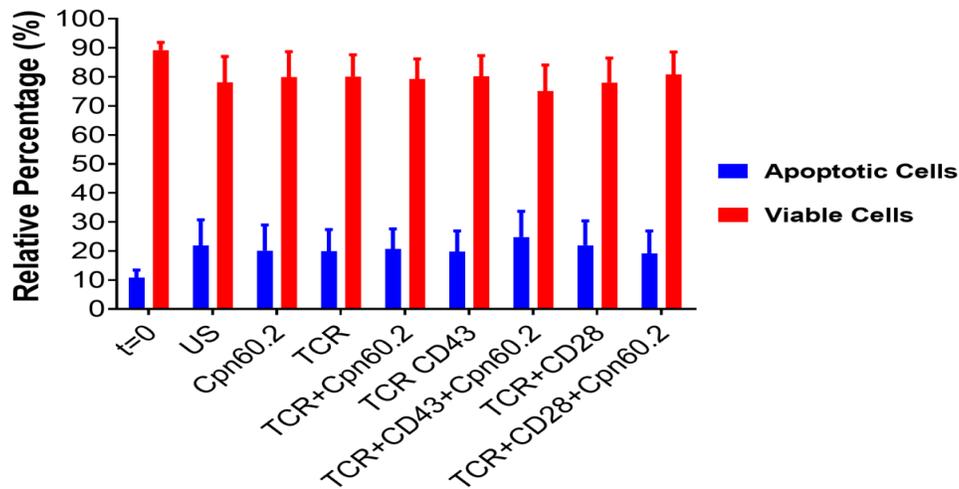
## **RESULTADOS**

### **1. Cpn60.2 no afecta la viabilidad de los linfocitos T, pero sí su estado de activación, particularmente en respuesta al estímulo TCR+CD43**

Los ensayos realizados con ratones CD43<sup>-/-</sup> mostraron que CD43 participa en la interacción Mtb-macrófago y en la restricción de la carga bacteriana (Fratuzzi *et al.* 2000, Randhawa *et al.* 2005, Randhawa *et al.* 2008), a través del reconocimiento de la chaperonina Cpn60.2 (Hickey *et al.* 2010). Recientemente, nuestro grupo demostró que la interacción de CD43 y Cpn60.2 lleva a la producción de TNF en macrófagos humanos y murinos (Torres-Huerta *et al.* 2017). El efecto de la interacción CD43-Cpn60.2 en la activación de linfocitos T humanos no ha sido evaluada.

Uno de los grandes cambios que ocurre durante la activación de los linfocitos es la expresión de los llamados marcadores de activación, los cuales participan de manera importante en las interacciones celulares que establecerán los linfocitos T con las APCs, complementando u oponiéndose a las señales del TCR. En un primer tiempo, para estimar el efecto de Cpn60.2 sobre la activación de los linfocitos T humanos, activamos los linfocitos T de cuatro donadores (pureza>95%, **Fig. S1**) con diferentes concentraciones de Cpn60.2, y medimos la viabilidad de las células, así como la expresión de los marcadores de activación: CD69, CD40L y CD25 (**Fig. 5 y 6**) después de 24 horas, para definir la dosis con la que trabajaríamos más adelante. Las condiciones experimentales fueron: US, activados a través del TCR, TCR+CD43 o TCR+CD28 en presencia o ausencia de Cpn60.2 (0.25, 2.5 o 25 µg/mL).

Por los parámetros de tamaño y granularidad, y en presencia de un marcador de viabilidad y un marcador de apoptosis, observamos que en cualquiera de las condiciones experimentales (**Fig. 5**), la viabilidad de las células no se vio afectada por la presencia de Cpn60.2 y osciló en todos los casos alrededor de 90% al término de la incubación.



**Figura 5. Cpn60.2 no afecta la viabilidad de los linfocitos T.** Los linfocitos T ( $5 \times 10^5$ ) fueron activados durante 24 horas a través de los siguientes estímulos: TCR, TCR+CD43 o TCR+CD28 en presencia o ausencia de Cpn60.2 ( $2.5 \mu\text{g/mL}$ ). Como control negativo (US), las células fueron cultivadas en RPMI. Al término de la incubación, las células fueron teñidas con el colorante de viabilidad 780 y anexina V y se evaluó la viabilidad celular. Como tiempo 0 ( $t=0$ ) se emplearon los linfocitos T recién purificados. La gráfica muestra los porcentajes de células muertas y vivas evaluados al  $t=0$  y 24 horas post-estimulación de cuatro donadores independientes  $\pm$  SEM. Se empleó una prueba pareada t-student de dos colas para evaluar la significancia entre condiciones.

En cuanto a la expresión de los marcadores de activación, independientemente de la concentración, Cpn60.2 solo, en ausencia de estímulos por TCR, TCR+CD43 o TCR+CD28, no induce la expresión de ninguno de los marcadores evaluados, tanto en linfocitos T CD4 como CD8 (**Fig. 6**).

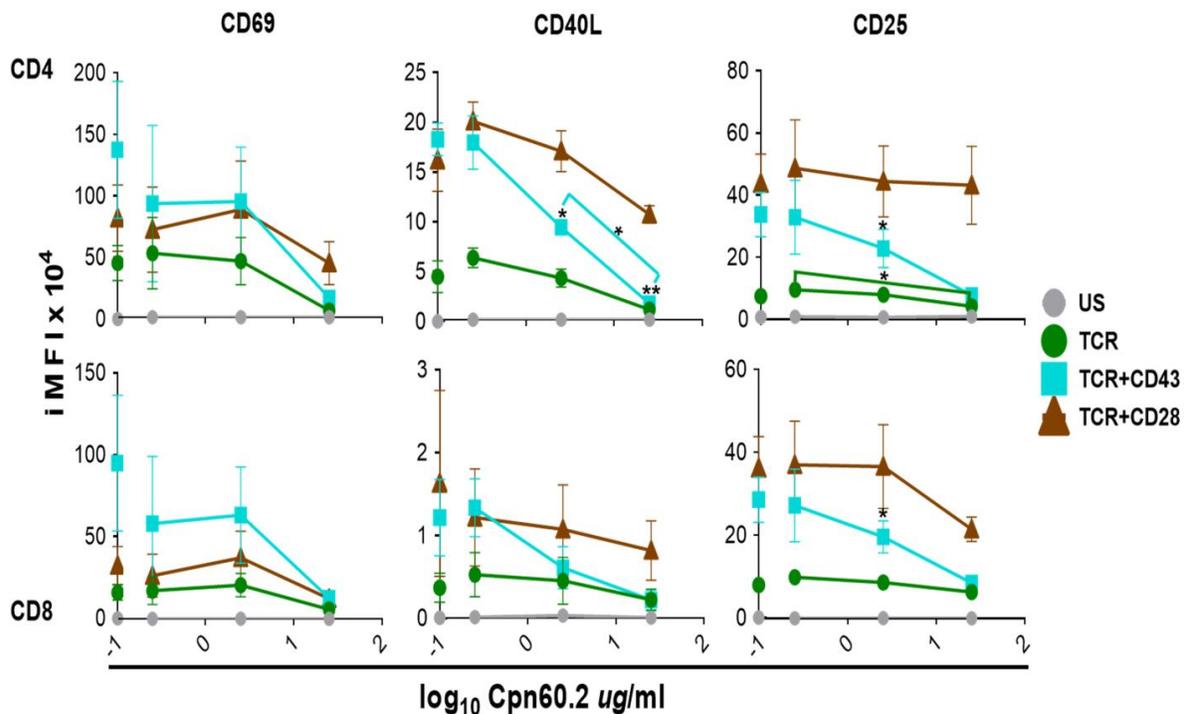
En cambio, cuando los linfocitos fueron activados por entrecruzamiento del TCR, TCR+CD43 o TCR+CD28 en presencia de Cpn60.2, el nivel de expresión de cada uno de los marcadores y la proporción de células positivas (reunidos en el iMFI) fue menor en presencia de Cpn60.2, de manera dosis-dependiente, comparado con las células estimuladas en ausencia de Cpn60.2, tanto en linfocitos T CD4 como CD8<sup>+</sup>. A menor concentración de Cpn60.2 mayor el nivel de expresión de CD69, CD40L y CD25 (**Fig. 6**).

Conforme a lo esperado (Simms and Ellis 1996), observamos que el **estímulo TCR** solo es un pobre inductor de la expresión de los marcadores de activación. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> expresan bajos niveles de CD69 en respuesta al entrecruzamiento del TCR siendo que, la expresión es mayor en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

en comparación a la observada en linfocitos T CD8<sup>+</sup> (aproximadamente el doble). Cuando las células fueron estimuladas con **TCR+Cpn60.2**, el número de células positivas y la MFI disminuyeron en función de la dosis de Cpn60.2, a la mayor concentración (25 µg/mL), las células ya no expresan CD69. Aunque la expresión de CD25 y CD40L es muy reducida en respuesta al estímulo del TCR solo, los niveles de estos dos marcadores no son significativamente distintos en presencia de las diferentes concentraciones de Cpn60.2, en comparación con los inducidos por el TCR (**Fig. 6**).

El estímulo **TCR+CD28** es considerado como un estímulo que proporciona señales que se complementan para producir una respuesta robusta en linfocitos T (Riha and Rudd 2010). Conforme a lo esperado, encontramos que el número de células positivas y los niveles de expresión de cada uno de los marcadores evaluados aumentaron en respuesta a este estímulo. En presencia de Cpn60.2, observamos que la expresión de CD69 y CD40L disminuye hasta un 50% en función de la dosis de Cpn60.2, no así la expresión de CD25, particularmente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (**Fig. 6**).

La intensidad de la respuesta al estímulo **TCR+CD43** resultó ser muy semejante a la del estímulo TCR+CD28, evidenciando la capacidad de CD43 de funcionar como una molécula co-receptora. De manera interesante, en presencia de Cpn60.2, a diferencia de lo observado con TCR+CD28+Cpn60.2, la expresión de CD40L y CD25 disminuye significativamente (hasta 100%) y de forma dosis-dependiente, comparado a las células estimuladas en ausencia de Cpn60.2. En particular, la dosis de 2.5 µg/mL de Cpn60.2 marca el punto de inflexión de las curvas.



**Figura 6. Cpn60.2 afecta el estado de activación de los linfocitos T a diferentes concentraciones.** Los linfocitos T ( $5 \times 10^5$ ) fueron activados a través del TCR, TCR+CD43 o TCR+CD28 en presencia o ausencia de Cpn60.2 (0.25, 2.5 ó 25  $\mu\text{g/mL}$ ). Como control negativo (US), las células fueron cultivadas en RPMI. Después de 24 horas, los niveles de expresión de CD69, CD40L y CD25 fueron evaluados. Las gráficas presentan el iMFI para cada marcador en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y representan el promedio de cuatro donadores independientes +/- SEM. \*\*p<0.01, \*p<0.05, prueba mixed-effects.

En conjunto estos resultados indican que, bajo las condiciones experimentales que establecimos y conforme a la literatura, los linfocitos T expresan los niveles esperados de los tres marcadores de activación evaluados. Así mismo, los resultados indican que Cpn60.2 por sí sola no compromete la viabilidad de los linfocitos, sin embargo, en combinación con las señales provistas por el TCR  $\pm$  co-estimuladores, regula la expresión de los marcadores evaluados. Es decir, Cpn60.2 repercute en el estado de activación de los linfocitos.

Los resultados mostrados en la **figura 6** indican que 2.5  $\mu\text{g/mL}$  de Cpn60.2 repercute negativamente en la activación de los linfocitos T, particularmente en respuesta al estímulo TCR+CD43, mientras que una concentración diez veces mayor inhibe la respuesta de los linfocitos, sin importar la naturaleza del estímulo.

Por esta razón decidimos emplear la concentración de 2.5 µg/mL de Cpn60.2 para evaluar el efecto de esta chaperonina sobre la funcionalidad de los linfocitos T.

## **2. Cpn60.2 regula negativamente la expresión de marcadores de activación, especialmente en linfocitos T activados por TCR+CD43.**

Con base en los resultados expuestos en la sección anterior, nos propusimos ampliar los resultados anteriores y evaluar si la presencia de la chaperonina de Mtb Cpn60.2 afecta de manera diferencial la expresión de más marcadores de activación (CD69, CD40L, CD25, OX40 y PD-1) en respuesta a la estimulación por el TCR, TCR+CD28 y TCR+CD43. Los linfocitos T purificados a partir de concentrados leucocitarios de doce donadores de banco de sangre (pureza >95%), fueron estimulados durante 24 o 72 horas bajo las siguientes condiciones experimentales: **no estimulados (US)**, activados en **ausencia o presencia de Cpn60.2** en combinación con los estímulos **TCR, TCR+CD43 o TCR+CD28** y evaluamos la expresión de los siguientes marcadores: CD69, CD40L, CD25, OX40 y PD-1 en las sub-poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por citometría de flujo.

La **figura 7A** muestra histogramas representativos de la expresión de los cinco marcadores en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados bajo las diferentes condiciones experimentales durante 24 ó 72 horas. Según la naturaleza del estímulo, el tiempo de estimulación y el tipo de linfocito (CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>), se observa una expresión diferencial de los marcadores. De una manera general, a los tiempos observados, encontramos que los linfocitos CD4<sup>+</sup> expresan niveles más elevados de los marcadores que los linfocitos CD8<sup>+</sup>, tanto en el número de células comprometidas como en el nivel de expresión.

En la **figura 7B** se muestran los resultados obtenidos a partir de los linfocitos purificados de doce donadores, observándose que las células US no expresan los marcadores, a ninguno de los dos tiempos evaluados. En consistencia con los resultados mostrados en la **figura 6**, las señales originadas a partir del entrecruzamiento de solo el TCR no son suficientes para inducir niveles elevados de ninguna de las moléculas evaluadas, detectándose la máxima expresión a las

72 horas en ambas poblaciones de linfocitos, salvo en el caso de CD69, que se considera un marcador de activación temprano.

En contraste, cuando las señales del TCR se complementan con las de CD28, se observan niveles elevados de todos los marcadores analizados. Acorde a lo reportado (Casamayor-Palleja *et al.* 1995, Simms and Ellis 1996, Reddy *et al.* 2004, Hochweller and Anderton 2005), los niveles de expresión de CD69 y CD40L alcanzan su máximo a las 24 horas, y los niveles de CD25, OX40 y PD-1 a las 72 horas, tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Así mismo, las señales generadas en respuesta al estímulo TCR+CD43 inducen la expresión de los cinco marcadores de activación, en magnitud similar a la resultante de las señales TCR+CD28.

Al comparar los co-estímulos TCR+CD28 y TCR+CD43, se observan ciertas diferencias que probablemente reflejan diferencias en las vías de señalización y en última instancia, en la función de estas dos moléculas co-receptoras. Cuando los linfocitos T se estimulan por TCR+CD43, los niveles de expresión de **CD69 y PD-1** son mayores a los observados en respuesta al estímulo TCR+CD28, alcanzando sus valores máximos a las 24 y 72 horas respectivamente. **CD40L** se expresa en niveles comparables en respuesta a TCR+CD28 y TCR+CD43 a los dos tiempos evaluados en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, en linfocitos CD8<sup>+</sup>, los niveles de CD40L son más elevados a las 72 horas en respuesta al estímulo TCR+CD43 que al estímulo TCR+CD28. En cuanto al nivel de expresión de **OX40**, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> es menor en respuesta a las señales de TCR+CD43 en comparación a los niveles inducidos por el estímulo TCR+CD28, tanto a las 24 como a las 72 horas. No así en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en los que, si bien la expresión de OX40 es menor a las 24 horas, es equiparable con la expresión inducida por TCR+CD28 a las 72 horas. Como en el caso de PD-1, los niveles de expresión de **CD25** son más elevados a las 72 horas en ambas poblaciones de linfocitos, en respuesta a los dos estímulos.

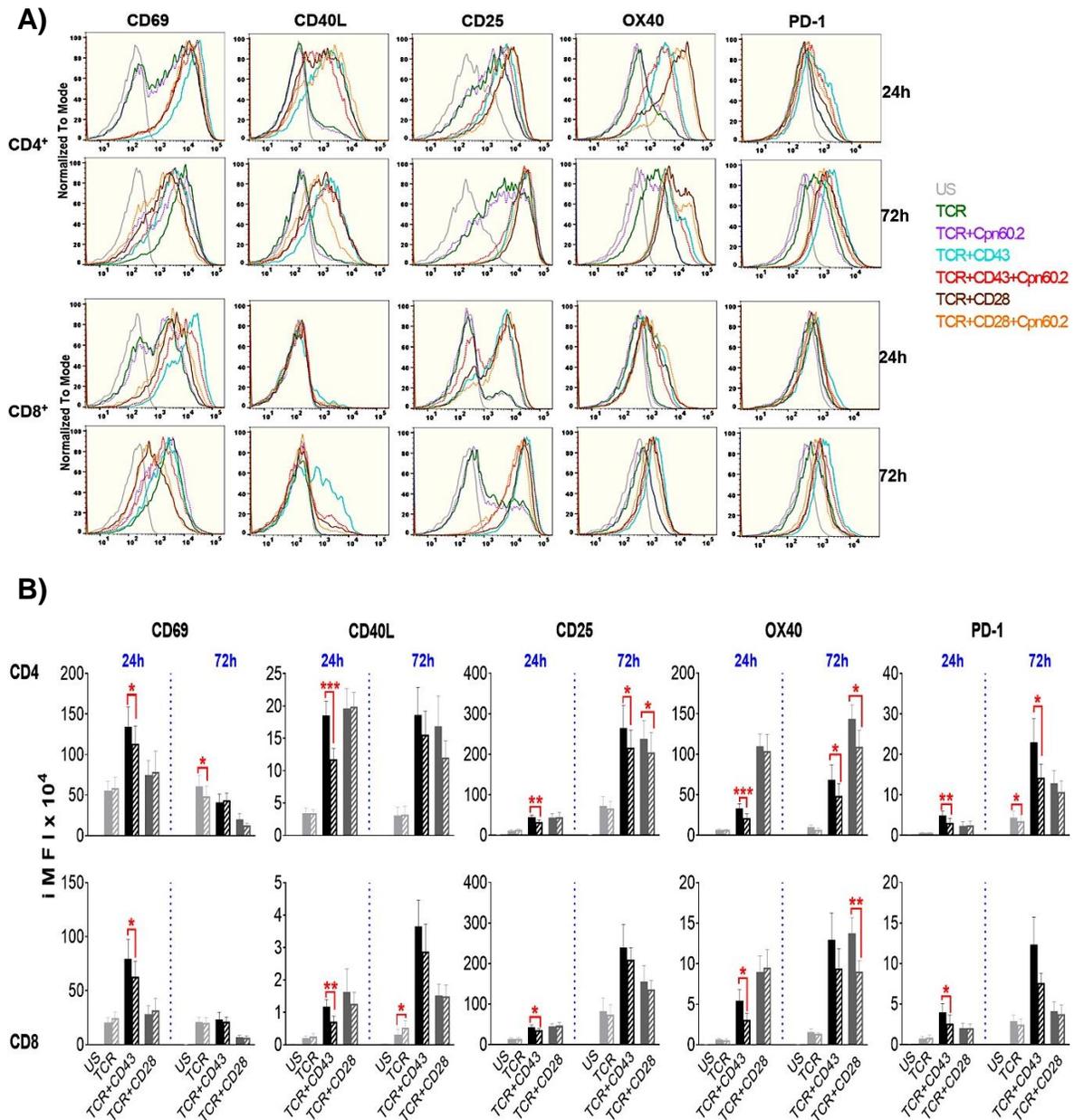
Cuando las células se estimularon por **TCR+Cpn60.2**, los niveles de expresión de todos los marcadores evaluados siguieron siendo muy bajos, sin embargo, a las 72 horas se observó una disminución significativa de la expresión de **CD69 y PD-1**

(20 y 14%, respectivamente) en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, en comparación a la condición sin Cpn60.2. En linfocitos T CD8<sup>+</sup>, a las 72 horas, la expresión de **CD40L** aumentó significativamente (200% aproximadamente) con respecto a los niveles detectados en las células estimuladas por el TCR (**fig. S3**).

En cuanto al efecto de Cpn60.2, tras la estimulación por **TCR+CD28+Cpn60.2**, los niveles de expresión de **CD25** disminuyeron significativamente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (~17%) a las 72 horas comparado a lo observado en ausencia de Cpn60.2. Igualmente, a las 72 horas, el estímulo TCR+CD28+Cpn60.2 resultó en una disminución en los niveles de expresión de **OX40** en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (~25 y 34%, respectivamente), en relación a la condición TCR+CD28. No se registraron diferencias en los niveles de **CD40L**, **CD69** y **PD-1** cuando las células fueron estimuladas con TCR+CD28 en presencia de Cpn60.2 a ninguno de los tiempos explorados (**fig. S3**).

En respuesta al estímulo **TCR+CD43**, la presencia de Cpn60.2 impacta negativamente la expresión de todos los marcadores en respuesta al estímulo **TCR+CD43**. A las 24 horas los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> expresan significativamente menos **CD69** (~19 y 20%, respectivamente). La expresión de **CD40L** se ve particularmente afectada a las 24 y 72 horas, tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. A las 24 horas, observándose una disminución de 35 y 38% en la expresión de este marcador en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente. El nivel de expresión de **CD25** disminuye también: a las 24 horas disminuye en promedio de 26 y 18%, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente. A las 72 horas también se redujo su expresión en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (~16%) (**fig. S3**). A las 24 horas la expresión de **OX40** disminuyó significativamente (~38 y 43% en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente), comparado a las células estimuladas con TCR+CD43 sin Cpn60.2. A las 72 horas, los niveles de expresión de este marcador también se ven disminuidos en las dos poblaciones de linfocitos, aunque solo de manera significativa en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La expresión de **PD-1** también disminuyó significativamente. Particularmente, a las 24 horas la reducción fue de 42% en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y 40% en linfocitos T CD8<sup>+</sup>. A las 72 horas, la tendencia fue la misma que la observada con OX40, siendo que la expresión de

PD-1 disminuyó en las poblaciones de linfocitos T, aunque solo de manera significativa en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (31%) (fig. S3).



**Figura 7. Cpn60.2 regula la expresión de marcadores de activación en linfocitos T activados por TCR+CD43.** Los linfocitos T ( $5 \times 10^5$ ) fueron activados durante 24 ó 72 horas a través de: TCR, TCR+CD43 o TCR+CD28 en presencia o ausencia de Cpn60.2 (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Como control negativo (US), las células fueron cultivadas en RPMI. A los tiempos indicados, se evaluaron los niveles de expresión de CD69, CD40L, CD25, OX40 y PD-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. **A)** Histogramas representativos de la expresión de los marcadores de activación evaluados a las 24 ó 72 horas post-estimulación. **B)** Las gráficas muestran el iMFI para cada marcador de activación después de 24 ó 72 horas de estimulación. Los datos mostrados representan el promedio de 12 donadores independientes  $\pm$  SEM. (Barras con relleno sólido activación sin Cpn60.2; barras con relleno de patrón activación con Cpn60.2). \*\*\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , prueba pareada de t-student de dos colas.

En conjunto, estos resultados señalan que en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, la presencia de Cpn60.2 interfiere en mayor o menor grado con las señales de activación resultantes de los tres estímulos estudiados: TCR, TCR+CD28, TCR+CD43. Particularmente, en el caso del estímulo TCR+CD43, Cpn60.2 inhibe significativamente la expresión de todos los marcadores de activación evaluados (**Fig. 7, S2 y S3**).

### **3. Cpn60.2 regula la producción de citocinas en linfocitos T activados por TCR+CD43**

Las citocinas son importantes mediadores de la respuesta inmune pues instruyen al organismo del estado de inflamación sistémico o local, y orquestan la participación de las diferentes cohortes de células de la respuesta inmunológica (Lin and Leonard 2019). En el contexto de las infecciones por Mtb, el balance de las citocinas pro y anti-inflamatorias en el ambiente pulmonar determinará la permanencia o erradicación del bacilo (Hossain and Norazmi 2013). Por tal motivo, procedimos a evaluar cómo Cpn60.2 impacta en linfocitos T la producción de estas citocinas.

Los sobrenadantes de cultivo de los linfocitos T activados por el TCR ± coestimuladores, en presencia o ausencia de Cpn60.2, fueron recolectados a las 24 y 72 horas y la concentración de citocinas fue evaluada por un ensayo multiplex (**Fig. 8**).

De manera general, observamos que todas las citocinas alcanzan su máxima concentración a las 72 horas, con excepción de TNF que se secreta en grandes cantidades desde las 24 horas, e IL-2 cuya concentración en los sobrenadantes de cultivo es mayor a las 24 horas que a las 72 horas en los estímulos TCR+CD28 y TCR+CD43. Al igual que lo observado para los marcadores de activación, se aprecia que en la condición US no hay producción de citocinas, confirmando el estado de reposo de los linfocitos. En consistencia con la pobre expresión de los marcadores de activación, el estímulo TCR no es suficiente para inducir grandes cantidades de ninguna de las citocinas evaluadas. Reflejando las elevadas señales de activación proporcionadas por el estímulo TCR+CD43, observamos

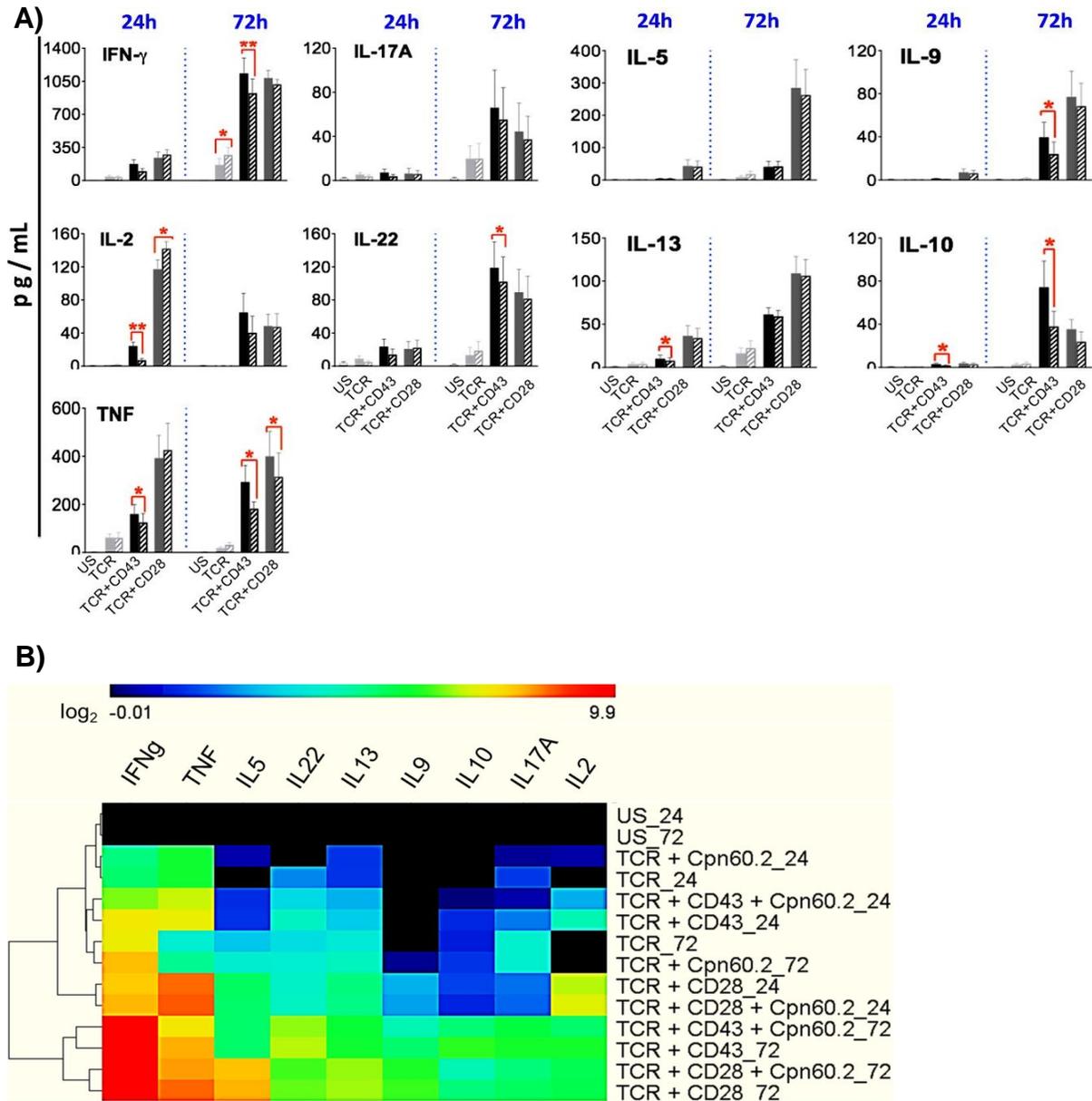
que, de una manera general, además de inducir la expresión de los marcadores de activación, los sobrenadantes de cultivo de las células estimuladas por TCR+CD43 contienen las mismas citocinas y en magnitud equiparable, a las inducidas en respuesta al estímulo TCR+CD28. El estímulo TCR+CD28 induce mayores cantidades de IL5, IL-9, IL-13 (ambos tiempos) y de TNF e IL-2 (solo a las 24 horas) en comparación a las observadas en respuesta al estímulo TCR+CD43, mientras que este último estímulo resulta en una mayor cantidad de IL-10 a las 72 horas (**Fig. 8A y S4**)

En presencia de Cpn60.2, las cantidades de citocinas secretadas no son significativamente modificadas en respuesta a las señales de los estímulos TCR y TCR+CD28. De manera interesante, así como la expresión de CD40L, únicamente, a las 72 horas, la concentración de IFN- $\gamma$ , aunque muy pequeña, aumentó significativamente (146%) en respuesta al estímulo TCR+Cpn60.2 en comparación al estímulo TCR. A las 72 horas, la cantidad de TNF secretada al medio en respuesta al estímulo TCR+CD28+Cpn60.2 disminuyó significativamente (23%), en comparación a las células estimuladas en ausencia de la chaperonina, mientras que, a las 24 horas se detecta un incremento (25%) en los niveles de IL-2 secretados al medio (**Fig. 8A y S4**).

En cambio, cuando las células son estimuladas vía TCR+CD43+Cpn60.2, la concentración de varias citocinas se ve significativamente disminuida en comparación con las células estimuladas con TCR+CD43. A las 72 horas se observa una reducción significativa en la concentración de IL-9, IL-22, IL-10, TNF e IFN- $\gamma$  (42, 19, 48, 29 y 19%, respectivamente). Asimismo, a las 24 horas encontramos una reducción significativa en la concentración de IL-2, IL-13, IL-10 y TNF (60, 19, 26 y 21%, respectivamente) (**Fig. 8 y S4**). De manera interesante, observamos que a diferencia del estímulo TCR+CD28, el estímulo TCR+CD43 no lleva a la producción de IL-4 (**Fig. S6**).

En conjunto estos resultados indican que Cpn60.2 altera la producción de citocinas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, activados a través del TCR, TCR+CD28 o TCR+CD43, de la misma manera que inhibe la expresión de los marcadores de activación. La **Fig. 8B** muestra como el efecto de Cpn60.2 es mucho más notorio

sobre el estímulo TCR+CD43 que sobre el estímulo TCD+CD28, sobre todas las citocinas evaluadas.



**Figura 8. Cpn60.2 regula la producción de citocinas en linfocitos T activados por TCR+CD43.** Los sobrenadantes de cultivo de los linfocitos T activados por TCR $\pm$ coestimuladores, en presencia o ausencia de Cpn60.2, como se describe en la Fig. 6, fueron recolectados a las 24 ó 72 horas y la concentración de citocinas fue evaluada por un ensayo multiplex. **A)** Concentración de citocinas. Barras con relleno sólido: activación sin Cpn60.2; barras con relleno de patrón: activación con Cpn60.2. US, sobrenadante de células cultivadas en RPMI. Promedio de 12 donadores independientes  $\pm$ SEM; \*\*p<0.01, \*p<0.05, prueba pareada de t-student de dos colas. **B)** El mapa de calor representa las concentraciones de citocinas producidas por linfocitos T en respuesta a los diferentes estímulos. La escala de color corresponde al log<sub>2</sub> de la concentración de las citocinas.

## **DISCUSION**

La literatura señala que las chaperonas humanas y micobacterianas son moléculas inmuno-moduladoras (Coates *et al.* 2008). En modelos murinos de artritis inducida por adyuvante, el pre-tratamiento de las ratas con Cpn60.2 micobacterianas protege de la artritis inducida por inyección con adyuvante completo de Freund (van Eden *et al.* 1988). Tal protección es proporcionada por los linfocitos T, pues si se transfieren linfocitos T de las ratas pre-tratados con Cpn60.2 a ratas “naïve”, y posteriormente se induce la artritis, se observa protección (van den Broek *et al.* 1989). De manera semejante, si se inmunizan ratas con Hsp65 propia (rHsp65), y después se induce artritis por inyección con adyuvante completo de Freund, se observa una disminución en la severidad de la enfermedad. La protección también se observa cuando se transfieren los linfocitos T cebados con rHsp65 a ratas con artritis inducida por adyuvante completo de Freund y que en consistencia con lo observado por (Paul *et al.* 2000), estos linfocitos T producen IFN- $\gamma$  e IL-10. Además, los linfocitos T de las ratas con artritis inducida por adyuvante completo de Freund generan espontáneamente linfocitos T reactivos tanto a rHsp65 como Cpn60.2 de Mtb (Durai *et al.* 2004).

Además de TLR2 y TLR4, la chaperona Cpn60.2 es reconocida por la molécula CD43 (Hickey *et al.* 2010), implicando a CD43 en la respuesta inmune ante Mtb. En consistencia con el hecho que los macrófagos CD43<sup>-/-</sup> fagocitan menos micobacterias, los ratones CD43<sup>-/-</sup> se infectan menos, pero a lo largo de la evolución de la enfermedad acaban por tener una carga bacteriana mayor (Randhawa *et al.* 2005), sugiriendo que CD43 participa en eventos tempranos y avanzados de la enfermedad. El trabajo reciente de nuestro laboratorio indica que la interacción entre CD43 y la chaperonina Cpn60.2 en macrófagos humanos o murinos lleva a la producción de TNF (Torres-Huerta *et al.* 2017).

Los estudios realizados para comprender las respuestas inmunológicas frente a la infección por Mtb, se han basado en modelos de infección *in vitro* o *in vivo*. Con la ayuda de modelos *in vitro* con PBMCs, el papel de los macrófagos ha sido caracterizado bastante bien referente a los mecanismos de activación y control del

crecimiento de la micobacteria. Sin embargo, en estos modelos, es difícil de evaluar la participación de las distintas poblaciones de linfocitos en la respuesta inmune contra Mtb, pues si bien es cierto que en las respuestas inmunológicas participan múltiples moléculas y tipos celulares, la simplificación y la disección de los componentes permite comprender la contribución específica de cada molécula/célula. Este proyecto se enfocó en determinar el efecto de la interacción entre estas dos moléculas, exclusivamente en los linfocitos T.

### **1. Cpn60.2 no afecta la viabilidad de los linfocitos T, pero sí su estado de activación, particularmente en respuesta al estímulo TCR+CD43**

Los resultados de los experimentos descritos en este trabajo indican que, por sí sola, la chaperonina Cpn60.2, no afecta la viabilidad de los linfocitos T ni induce su activación (**Fig. 5 y 6**). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad que Cpn60.2, afecte alguna otra función de estos linfocitos, ya que moléculas como Hsp60 (mamíferos) y LPS, que no afectan la proliferación o secreción de citocinas, modulan la capacidad de adhesión y migración de las células (Zanin-Zhorov *et al.* 2005, Zanin-Zhorov *et al.* 2007).

Si bien se observa una disminución en los niveles de expresión de los marcadores de activación analizados independientemente de la concentración de Cpn60.2 y del estímulo (TCR, TCR+CD28, TCR+CD43), en consistencia con el hecho que Cpn60.2 interacciona con CD43, el efecto inhibitorio fue más acentuado en respuesta al estímulo TCR+CD43. La concentración de 2.5 µg/mL inhibió la expresión de CD40L y CD25 de los linfocitos T estimulados con TCR+CD43, mientras que en presencia de 10 veces más Cpn60.2, la expresión de los marcadores de activación es inhibida, independientemente del estímulo (**Fig. 6**).

La afinidad, duración y el orden con que ocurren las interacciones son clave para regular la funcionalidad de las células (Fierro *et al.* 2006, Pedraza-Alva *et al.* 2011, Cheng *et al.* 2015). En este sentido, no podemos descartar la posibilidad de que en nuestro modelo de activación, en presencia de grandes cantidades de Cpn60.2 (25 µg/mL), las moléculas que interactúen primero sean el par Cpn60.2-CD43, compitiendo de alguna forma con el anticuerpo anti-CD43. En este mismo

escenario, también se podría pensar que al recibir un exceso de señales-co-estimuladoras, la funcionalidad de las células se ve afectada, conforme a lo reportado en la literatura (Wijewarnasuriya *et al.* 2020), perdiéndose la especificidad del efecto sobre las señales de CD43.

Considerando que los linfocitos T activados y células Treg expresan TLR2 y TLR4 (Komai-Koma *et al.* 2004, Komai-Koma *et al.* 2009, Milkova *et al.* 2010), mismo que corroboramos en este trabajo (**Fig. S5**), y que Cpn60.2 también es reconocido por estos TLRs, es posible que en las condiciones donde Cpn60.2 se encuentra en exceso (25 µg/mL) interactúe también con estos receptores, sobrepasando el efecto específico que se observa sobre el estímulo TCR+CD43 a concentraciones menores de Cpn60.2. También se podría pensar que las células Treg se activen y medien el efecto inhibitorio.

Claramente, Cpn60.2 inhibe la activación de los linfocitos T, específicamente, cuando son activados en presencia del TCR+CD43. A partir de 2.5 µg/mL observamos el punto de inflexión en las curvas y por tal motivo, decidimos emplear esa concentración porque permite evaluar el efecto específico de la interacción CD43-Cpn60.2 sobre la activación de los linfocitos T. Aunque no se han realizado estudios para cuantificar esta chaperonina en sobrenadantes de pulmón, fluido pleural o fluidos de lavado bronqueoalveolar (BALF, por sus siglas en inglés), se ha medido en el suero de pacientes con tuberculosis (<1 ng/mL) (Sethna *et al.* 1998) y en el fluido cerebroespinal de pacientes con meningitis tuberculosa (84–436 ng/mL) (Mudaliar *et al.* 2006). Será interesante evaluar si la concentración de 2.5 µg/mL de Cpn60.2 refleja la concentración biológica presente en los granulomas de pacientes con tuberculosis o ratones infectados.

## **2. Cpn60.2 regula negativamente la expresión de marcadores de activación, especialmente en linfocitos T activados por TCR+CD43.**

Con un mayor número de individuos sanos, además de evaluar la expresión de CD69, CD40L y CD25, evaluamos la expresión de OX40 y PD-1, dos moléculas cuya expresión también se ve aumentada en pacientes con tuberculosis. Similar a lo observado en la **Fig. 6**, en respuesta al estímulo TCR+CD43, Cpn60.2 redujo significativamente la expresión de todos los marcadores en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a las 24 horas, pero a las 72 horas, y únicamente en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, solo CD25, OX40 y PD-1 se expresan en cantidades significativamente menores en relación al estímulo TCR+CD43, aunque se aprecia la misma tendencia inhibitoria para el resto de los marcadores en ambas poblaciones de linfocitos T (**Fig. 7, S2 y S3**). En cambio, en respuesta a la estimulación por TCR+CD28, la presencia de Cpn60.2 únicamente provoca una reducción significativa en la expresión de CD25 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y de OX40 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a las 72 horas (**Fig. 7, S2 y S3**). En el caso de la estimulación por TCR+Cpn60.2, observamos cambios significativos en la expresión de CD69 (reducción en linfocitos T CD4<sup>+</sup>), CD40L (aumento en linfocitos T CD8<sup>+</sup>) y PD-1 (reducción en linfocitos T CD4<sup>+</sup>) a las 72 horas, con respecto al estímulo TCR. Sorpresivamente, y en una aparente contradicción de la tendencia a montar respuestas T<sub>H</sub>1 de CD43, la expresión de PD-1 es mayor en respuesta al estímulo TCR+CD43 que al estímulo TCR+CD28, y la presencia de Cpn60.2 únicamente abate significativamente la expresión de PD-1 en la respuesta mediada por TCR+CD43, pero no aquella mediada por TCR+CD28, o el TCR solo.

Los marcadores que analizamos modulan la funcionalidad de los linfocitos T y se expresan diferencialmente en pacientes con tuberculosis o individuos sanos. Se ha observado que individuos infectados expresan mayores niveles de CD69 que individuos sanos en CC, incluso cuando las células de estos individuos son activadas *in vitro* con los péptidos ESAT-6 y CFP10 (Chen *et al.* 2020). La expresión de CD69 en linfocitos T (CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>) de pacientes infectados se asocia a un fenotipo de células efectoras y de memoria, siendo células polifuncionales que secretan más de una citocina simultáneamente (IL-2, TNF e

IFN- $\gamma$ ) (Li *et al.* 2011, Li *et al.* 2014). El hecho que en presencia de Cpn60.2, las células expresen menos CD69 en respuesta al estímulo TCR+CD43 sugiere que la interacción de Cpn60.2 con CD43 en la superficie de los linfocitos T tiene un efecto negativo sobre la capacidad efectora de los linfocitos T

Para CD40L, se ha observado que su ausencia, la interrupción en su activación, o la expresión de ciertos polimorfismos (SNPs) en CD40L, constituyen un factor de riesgo para padecer tuberculosis (Hu *et al.* 2015). Las señales intracelulares dependientes de CD40L favorecen la producción de IFN- $\gamma$  (Samten *et al.* 2000), esencial para el control de la micobacteria (Hogan *et al.* 2001), y la actividad antimicrobiana en los macrófagos (Klug-Micu *et al.* 2013). En consistencia con la disminución de la expresión de CD40L cuando los linfocitos T son activados por el estímulo TCR+CD43 en presencia de Cpn60.2, nuestros resultados muestran que la interacción de Cpn60.2 con CD43 disminuye también la producción de IFN- $\gamma$ , posiblemente explicando parcialmente porque los ratones CD43<sup>-/-</sup> tienen una carga bacteriana mayor que sus contrapartes silvestres.

Gran parte de la investigación referente a CD25 se ha centrado en el papel de las células Treg, las cuales representan entre el 5 y 10% de los linfocitos T circulantes (Pang *et al.* 2013), y expresan constitutivamente a CD25. Se ha observado que en pacientes con tuberculosis hay una mayor proporción de células Treg que en individuos sanos, tanto en sangre periférica como en fluido pleural (Hougardy *et al.* 2007, Mahan *et al.* 2009, Herzmann *et al.* 2012). En los experimentos que realizamos, únicamente diferenciamos entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, pero no incluimos marcadores como FoxP3 para analizar el efecto de Cpn60.2 sobre la subpoblación de células Treg. En linfocitos T efectores, la expresión de CD25 proporciona señales de proliferación y diferenciación en células de memoria. El hecho que en presencia de Cpn60.2, los linfocitos T expresen menos CD25, particularmente, en respuesta al estímulo TCR+CD43, sugiere que esos linfocitos T no se diferencian tan bien como sus contrapartes estimulados en ausencia de Cpn60.2, y que sean peores productores de citocinas como IFN- $\gamma$ , lo cual comprobamos.

La expresión de OX40 se ha empleado para identificar respuestas de memoria frente a tuberculosis o bien para diferenciar tuberculosis activa de tuberculosis latente (Skoberne *et al.* 2000, Ubolyam *et al.* 2021). La vacunación de ratones con BCG en presencia de OX40-IgG (proteína de fusión), genera respuestas inmunológicas fuertes contra Mtb, resultando en un mayor reclutamiento de leucocitos al pulmón, una menor carga bacteriana y mayor producción de IFN- $\gamma$  en comparación a ratones vacunados con BCG o sin vacunar (Snelgrove *et al.* 2012), implicando a OX40 en la respuesta inmune contra Mtb. El hecho que la expresión de OX40 sea menor en respuesta al estímulo TCR+CD43+Cpn60.2 sugiere que a través de la interacción CD43-Cpn60.2, la micobacteria incapacita a los linfocitos T, disminuyendo su capacidad de montar una respuesta efectiva.

Acorde a la función reguladora negativa de PD-1, la expresión de este marcador está aumentada en los linfocitos T efectores responsivos y Treg de pacientes con TB y en modelos animales de infección por Mtb (Shen *et al.* 2016, Wong *et al.* 2018, Li *et al.* 2019). El bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 resulta en un incremento de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ , así como una mayor actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> hacia monocitos y macrófagos infectados por Mtb (Li *et al.* 2019, Suarez *et al.* 2019). Nuestros resultados indican que el estímulo TCR+CD43+Cpn60.2 también provoca una disminución en el nivel de expresión de PD-1, sin embargo, esta disminución no parece ser suficiente para contrarrestar la disminución en la expresión de los demás marcadores de activación, y restablecer la producción IFN- $\gamma$  (**Fig. 7 y 8**). Las diferencias entre nuestros resultados y los de la literatura podrían atribuirse a los modelos de activación: forma de activar (anticuerpos solubles vs en placa), tipo celulares empleados para estimular (PBMCs o linfocitos T), antígenos particulares vs lisados de Mtb vs BCG, *in vivo* o *in vitro*, etc.

De una manera general, los resultados obtenidos sugieren que Cpn60.2 regula negativamente la activación de los linfocitos T, y que su efecto es particularmente conspicuo en el caso del estímulo TCR+CD43.

### **3. Cpn60.2 regula la producción de citocinas en linfocitos T activados por TCR+CD43**

Como se describió anteriormente, las citocinas y sus funciones son cruciales en el contexto de la infección por tuberculosis, pues el balance entre el ambiente inflamatorio y anti-inflamatorio definirá cómo evoluciona la enfermedad. Similar a lo observado para los marcadores de activación, nuestros resultados muestran que la inhibición que induce Cpn60.2 en la producción de las citocinas no es “todo o nada”, de hecho la regulación es muy fina, lo que sugiere que a través de Cpn60.2 y seguramente a través de otras moléculas, Mtb regula finamente el balance de citocinas en el hospedero para sobrevivir y propagarse. Cada una de las citocinas evaluadas participa regulando positiva o negativamente los niveles de inflamación en el contexto de la infección por tuberculosis.

IFN- $\gamma$  potencia las funciones microbicidas de los macrófagos y su capacidad de presentación de antígenos (O'Garra *et al.* 2013). Las disfunciones en el eje IL-12/IFN- $\gamma$  y sus respectivos receptores, aumenta la susceptibilidad a infecciones por Mtb y la severidad de la enfermedad (Cooper *et al.* 1993, Flynn *et al.* 1993, Caragol *et al.* 2003, Dorman *et al.* 2004, Boisson-Dupuis *et al.* 2011).

El TNF tiene un papel central en la respuesta inmune contra Mtb. Los modelos murinos y los estudios en humanos muestran que la deficiencia o el uso de anticuerpos anti-TNF aumenta la severidad de la enfermedad (Flynn *et al.* 1995, Flynn and Chan 2001, Keane *et al.* 2001, Harris and Keane 2010) debido a la capacidad reducida de los macrófagos de controlar el crecimiento intracelular de la micobacteria al producir menos ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés). Además se ha observado que TNF es crucial para la formación y mantenimiento de la integridad de los granulomas (O'Garra *et al.* 2013).

La IL-2 se ha usado como marcador para el diagnóstico de TB. En particular, hay más IL-2 en los sobrenadantes de PBMCs estimulados con antígenos de TB en pacientes con TB latente, lo que permite diferenciar TB latente de TB activa (Sun *et al.* 2016, Suzukawa *et al.* 2016). De hecho, IL-2 ha sido empleado como agente terapéutico para tratar la tuberculosis multi-drogo resistente MDR (por sus siglas

en inglés), observándose una menor patología, con una mayor tasa de eliminación de la bacteria (Zhang *et al.* 2012, Tan *et al.* 2017, Liu *et al.* 2019).

IL-10 pertenece al grupo de las citocinas regulatorias y es producida principalmente por linfocitos Treg, aunque también la producen otros tipos celulares ( $T_H2$ , macrófagos, células dendríticas, etc.). Esta citocina contrarresta las respuestas inflamatorias inducidas por las citocinas  $T_H1$  y  $T_H17$ . IL-10 inhibe la producción de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-17. El bloqueo de IFN- $\gamma$  inhibe la maduración del fagolisosoma en macrófagos, impidiendo la correcta activación de los macrófagos, reduciendo su capacidad antimicrobiana y de presentación de antígenos (Domingo-Gonzalez *et al.* 2016). En el contexto de tuberculosis, su expresión se considera también como un marcador para distinguir entre TB latente de TB activa (Tebruegge *et al.* 2015), y la acumulación de linfocitos T IL-10<sup>+</sup> está ligada al incremento en la carga bacteriana y una mayor severidad de la enfermedad (Eum *et al.* 2008, Kumar *et al.* 2015).

Por su capacidad para inducir respuestas  $T_H1$  robustas, IL-17A es principalmente producida por los linfocitos T  $\gamma\delta$  de los pulmones (Khader *et al.* 2007, Umemura *et al.* 2007, Lombard *et al.* 2016), participando en la maduración y estabilidad de los granulomas (Umemura *et al.* 2007). En pacientes con tuberculosis crónica, la producción de IL-17A está reducida en comparación a individuos sanos. Tal defecto parece estar relacionado con el agotamiento de los linfocitos T resultante de la estimulación persistente con antígenos de TB, un proceso en donde PD-1 parece estar implicado, ya que su bloqueo restaura la producción de IL-17A (Shen and Chen 2018).

Los linfocitos T  $\gamma\delta$ , los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y los linfocitos T foliculares producen IL-21 (Shen and Chen 2018). En los pulmones de ratones infectados por Mtb, IL-21 promueve el reclutamiento y acumulación de linfocitos T, la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos así como un incremento en la producción de citocinas  $T_H1$ . Los linfocitos T de ratones deficientes en IL-21R presentan un fenotipo de agotamiento (son TIM-3<sup>+</sup> y PD-1<sup>+</sup>), y los ratones presentan una mayor carga bacteriana en pulmones y mayor mortalidad que los animales silvestres (Booty *et al.* 2016). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y las células NKT de

fluido pleural de individuos infectados con Mtb estimulados con los péptidos ESAT-6/CFP-10 producen IL-21, IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF, pero no citocinas T<sub>H</sub>2 o T<sub>H</sub>17, expresan altos niveles de CD40L (marcador asociado a la polifuncionalidad de los linfocitos T) y adquieren un fenotipo de memoria (Wu *et al.* 2015, Li *et al.* 2016).

En pacientes con TB, la IL-22, producida principalmente por células NK y linfocitos T, se encuentra en mayor concentración en BALF, pero muy poco en suero (Shen and Chen 2018). IL-22 induce la producción de péptidos antimicrobianos (como lipocalina,  $\beta$ -defensinas y calgranulina A) en células epiteliales pulmonares, monocitos y macrófagos (Dhiman *et al.* 2014, Guillon *et al.* 2015), y de TNF (Treerat *et al.* 2017), promoviendo el control del crecimiento intracelular de la micobacteria en macrófagos. En particular, la calgranulina A favorece la maduración del fagolisosoma, con la consecuente reducción de la carga bacteriana (Dhiman *et al.* 2009, Dhiman *et al.* 2014).

La IL-6 es producida por múltiples células de origen inmune y no inmune (Van Snick 1990). En el contexto de la tuberculosis, se encuentra en mayor cantidad en el suero de pacientes con TB que de sujetos sanos (Clifford *et al.* 2015), y se piensa que es importante durante el control de la progresión de TB no cavitatoria a TB cavitatoria, siendo que en este último escenario, los niveles de IL-6 están reducidos en el BALF de los pacientes y hay una mayor presencia de neutrófilos (Nolan *et al.* 2013). Si bien la deficiencia de IL-6 no lleva a la muerte a ratones infectados por Mtb, estos ratones presentan un incremento en la carga bacteriana y una disminución en la generación de las respuestas protectoras dependientes de IFN- $\gamma$  (Saunders *et al.* 2000).

Las citocinas T<sub>H</sub>2 (IL-4, IL-5 e IL-13) antagonizan e inhiben las respuestas T<sub>H</sub>1, Los PBMCs de pacientes con TB activa producen menos IL-4 que los individuos control (Domingo-Gonzalez *et al.* 2016), y en el plasma de pacientes con TB, los niveles de IL-4 son mayores que en individuos en CC (Mihret *et al.* 2013). También se ha observado un aumento de la expresión del mRNA de IL-4 en zonas necróticas de pulmones de pacientes HIV<sup>+</sup> co-infectados con TB (Bezuidenhout *et al.* 2009), y en pacientes que presentan cavitación de los granulomas se observó un incremento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>-IL-4<sup>+</sup> (Mazzarella *et al.* 2003).

En el BALF y en sangre periférica de pacientes con TB se ha observado un incremento de células productoras de IL-5 en respuesta a la estimulación por PPD (Morosini *et al.* 2005, Giampietro *et al.* 2010). Otro estudio reportó que los PBMCs de pacientes con TB moderada que recibieron tratamiento y que fueron estimulados con PPD producen menos IL-5 desde los 6 días post-tratamiento, mientras que en los casos de TB severa, se produce más IL-5 (Cozmei *et al.* 2007).

La información acerca del papel de IL-13 en TB es escasa, sin embargo, se habla de un eje IL-4/IL-13 en el que niveles altos de IL-4 y de IL-13 correlacionan con el daño tisular en el pulmón (Heitmann *et al.* 2014). IL-13 inhibe el proceso de autofagia en los macrófagos infectados (Harris *et al.* 2007) y por otra parte, ratones que sobre-expresan IL-13 presentan mayor mortalidad y daño en los pulmones, porque hay más granulomas necróticos y los macrófagos en estos granulomas expresan mayores niveles de arginasa, que los ratones WT (Heitmann *et al.* 2014). En consistencia con lo anterior, los niños con TB latente presentan mayores niveles de IL-13 que los no infectados (Dhanasekaran *et al.* 2013).

Junto con otras citocinas, la expresión de IL-9 puede diferenciar TB activa de otras micobacterias no tuberculosas (Yu *et al.* 2012, Hur *et al.* 2015), y la estimulación por antígenos de Mtb resulta en una producción de IL-9 mayor en las células de pacientes con TB estimuladas que las de individuos sanos (Anbarasu *et al.* 2013). Los niveles de IL-9 se han asociado a un bloqueo en la diferenciación y maduración de DCs (disminución en la expresión de HLA-DR, CD86 y CD206). Además, disminuye la expresión de IL-12 $\beta$  y por ende afecta la activación, proliferación de células T así como su producción de IFN- $\gamma$  (Wu *et al.* 2008).

Nuestros resultados indican que en paralelo a lo observado para la expresión de los marcadores de activación, solo para el estímulo TCR+Cpn60.2, a las 72 horas, se encontró un incremento de IFN- $\gamma$ , aunque la producción de IFN- $\gamma$  es realmente muy pequeña. A las 24 horas, el estímulo TCR+CD28+Cpn60.2 resultó también en un ligero incremento en la producción de IL-2. A excepción de estas dos condiciones, la adición de Cpn60.2 resultó en una disminución en la capacidad de respuesta de las células. La reducción en la producción de la mayoría de las

citocinas fue notoriamente más significativa en la condición TCR+CD43+Cpn60.2 que en la condición TCR+CD28+Cpn60.2. A las 24 horas observamos una reducción en la producción de IL-2, TNF, IL-13 e IL-10, y a las 72 horas de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-22, IL-10 e IL-9. En el estímulo TCR+CD28+Cpn60.2 solo a las 72 horas observamos una reducción significativa en la producción de TNF (**Fig. 8**).

De las 13 citocinas que permite evaluar el kit, no logramos identificar tres citocinas (IL-6, IL-17F e IL-21). Es posible que la producción de estas citocinas no sea óptima a los tiempos que evaluamos o que requiere de múltiples interacciones entre distintos tipos celulares (PBMCs versus linfocitos T), que al ser estimuladas secreten diferentes factores que en última instancia incidirán sobre la activación y diferenciación de los linfocitos T, y que cuando se emplean linfocitos T purificados, la activación de las células no sea tan completa. IL-4 solo es inducida en las condiciones donde se estimula a través de TCR+CD28, pero no en las condiciones del TCR $\pm$ CD43 (**Fig. S6**).

De una manera general, observamos que el efecto inhibitorio de Cpn60.2 sobre la expresión de marcadores de activación y la producción de citocinas es mayor, específicamente, en el caso del estímulo TCR+CD43. Lo anterior contrasta con el hecho de que en macrófagos, Cpn60.2 induce la producción de TNF $\alpha$ , de forma CD43-dependiente.

El efecto opuesto observado en estos dos tipos celulares podría deberse a que los linfocitos T y los macrófagos expresan cantidades disimiles de TLR2 y TLR4, siendo estos más abundantes en macrófagos que en linfocitos T. Dado que TLR2 y TLR4 también participan en el reconocimiento de Cpn60.2, es posible que en macrófagos, las vías de señalización inducidas por las interacciones TLR2/TLR4-Cpn60.2 y CD43-Cpn60.2 se complementen y resulten en la activación de la producción de TNF. En cambio en linfocitos T, quizás debido a la baja expresión de estos TLRs, la contribución de la vía de señalización inducida por TLR2/TLR4-Cpn60.2 sea de menor intensidad y que al interaccionar Cpn60.2 con CD43, la intensidad de las señales del estímulo TCR-CD43 sea menor, resultando en una menor activación y producción de citocinas por parte de los linfocitos T. Alternativamente, podría pensarse que en linfocitos T la interacción de CD43 con

Cpn60.2 induce una vía de señalización distinta a la inducida por el entrecruzamiento de CD43 con el mAb L10, el cual reconoce las dos isoformas de CD43 (115 y 150 kDa) que se encuentran en la superficie de los linfocitos T. Si este fuera el caso, el efecto inhibitorio de Cpn60.2 podría reflejar el reclutamiento de moléculas inhibitorias que abatieran la intensidad de las señales generadas por el estímulo TCR-CD43, en particular SHP-1 o c-Cbl. También es posible que al interactuar con CD43, Cpn60 compita por los sitios de reconocimiento del mAb L10, atenuando entonces la intensidad de la señal extracelular. Para distinguir entre estas alternativas se requiere de experimentos adicionales.

## **CONCLUSIONES**

Con base en nuestros resultados, concluimos lo siguiente:

- 1) Cpn60.2 inhibe la activación de los linfocitos T humanos, por un mecanismo que no es dependiente de la muerte celular.
- 2) Cpn60.2 inhibe la activación de los linfocitos T humanos, preferentemente en combinación con el estímulo TCR+CD43, en concordancia con el hecho que esta chaperonina ha sido identificada como un ligando de CD43. La presencia de Cpn60.2 regula negativamente la expresión de los marcadores de activación y la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias.
- 3) Las señales proporcionadas por el entrecruzamiento de CD43 y el TCR inducen una activación robusta, en magnitud similar a la inducida por CD28, pero con un sesgo diferente, siendo que las señales de CD43 favorecen más una respuesta tipo  $T_H1$  que las de CD28, que resultan en una respuesta menos polarizada.

Aunque nuestro trabajo no proporciona información acerca de los mecanismos moleculares que son responsables del efecto inhibitorio de Cpn60.2. Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que parte del efecto inhibitorio de Cpn60.2 se puede explicar por el hecho que los niveles de expresión de CD40L

inducidos por los estímulos TCR+CD28 o TCR+CD43 disminuyen en presencia de Cpn60.2. Esto podría ser el detonador de un efecto “generalizado” ya que las señales dependientes de CD40L son necesarias para la activación de los genes de las citocinas  $T_H1$  y  $T_H2$ .

Río arriba de CD40L, el efecto inhibitorio ejercido por Cpn60.2 cuando los linfocitos T son estimulados por TCR+CD43 es reminiscente de lo reportado con dos anticuerpos monoclonales, los anticuerpos 10G7 y 6E5, los cuales reconocen dos epítomos distintos del dominio extracelular de CD43 (Modak *et al.* 2016). Cada uno de estos anticuerpos genera respuestas diferentes resultantes de señales intracelulares distintas dentro de los linfocitos T. A pesar de inducir la expresión de marcadores de activación de manera muy semejante, cada uno de estos anticuerpos dirige a las células hacia patrones de citocinas distintas: pro-inflamatorias (6E5) o reguladoras/supresoras (10G7). Además, los linfocitos activados con TCR+10G7 proliferan menos y presentan capacidades supresoras. Asimismo, en ese mismo trabajo se reporta que los agregados entre linfocitos T pre-activados con el mAb 10G7 y las DCs no son tan compactos como los formados cuando los linfocitos son pre-activados con el mAb 6E5.

Considerando los resultados expuestos en este trabajo, cabe preguntarse si Cpn60.2 interacciona con CD43 en una región cercana al epítomo reconocido por el anticuerpo 10G7, dando lugar a una vía de señalización intracelular que activa a las células para adquirir un fenotipo más regulador. Asimismo cabe preguntarse si la interacción de Cpn60.2 con CD43 interfiere con las interacciones moleculares que rigen la formación de agregados homo- y hetero-celulares en diferentes situaciones biológicas, y que preceden la activación exitosa de los linfocitos. Esto porque, a lo largo de los experimentos realizados observamos que en respuesta al estímulo TCR+CD43+Cpn60.2, el tamaño y compactación de los agregados celulares era menor al del estímulo TCR+CD43, mientras que los agregados formados en respuesta a los estímulos TCR y TCR+CD28 eran similares en presencia u ausencia de Cpn60.2 (datos no mostrados). De manera interesante, los linfocitos T pre-activados con el anticuerpo 10G7 forman menos agregados y

de menor compactación con DCs que los linfocitos T pre-activados con 6E5, siendo el proceso menos dependiente de LFA-1/ICAM-1.

La formación de agregados celulares homo-típicos es necesaria para una correcta activación de los linfocitos T (Varga *et al.* 2010). Entre las moléculas de adhesión que participan en la formación estos agregados se encuentran LFA-1 e ICAM-1 (Wang *et al.* 2009, Varga *et al.* 2010, Walling and Kim 2018). CD43 también participa en la formación de agregados homo-típicos (Nong *et al.* 1989, de Smet *et al.* 1993, Rosenkranz *et al.* 1993, Layseca-Espinosa *et al.* 2003) y muchos de los ligandos de CD43 están relacionados con la adhesión y migración de los leucocitos, entre ellos se encuentran LFA-1 (Khunkaewla *et al.* 2008), ICAM-1 (Rosenstein *et al.* 1991), E-selectina (Matsumoto *et al.* 2005) y Siglec-1 (van den Berg *et al.* 2001). Además de potencialmente interactuar con CD43 en el epítotope 10G7, Cpn60.2 podría potencialmente interferir la interacción de ICAM-1 en CD43, modificando así la estequiometría de las interacciones moleculares que participan en la adhesión célula-célula, regulando de esta manera la activación de los linfocitos T. Lo anterior explicaría la reducción en tamaño de los agregados homo-típicos observados en nuestros experimentos.

En condiciones normales, la vía de señalización PD-1/PD-L1 funciona como un freno que controla la tolerancia y la amplitud de la respuesta inmune disparando una serie de señales intracelulares que contrarrestan las del TCR±moléculas co-estimuladoras. Esta vía de señalización es explotada por las células cancerosas pero también por los agentes patógenos tales como Mtb. En un modelo de macacos infectados por Mtb, los linfocitos T de los granulomas, particularmente los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, expresan altos niveles de PD-1, pese a lo cual no presentan agotamiento y producen múltiples citocinas (Wong *et al.* 2018). El hecho que las señales de CD43 combinadas con las del TCR resulten en una elevada expresión de PD-1, mayor a la inducida por el TC+CD28 agrega un nivel más de complejidad a la ya compleja función de esta sialomucina. En cualquier caso, los resultados obtenidos muestran que Cpn60.2 regula finamente la activación de los linfocitos T preferentemente en respuesta al estímulo TCR+CD43 e impacta negativamente en la funcionalidad de estas células. Se podría especular que en el contexto de los

granulomas, la interacción CD43-Cpn60.2 también afecte la funcionalidad de los linfocitos T y sea ventajoso para Mtb.

## **PERSPECTIVAS**

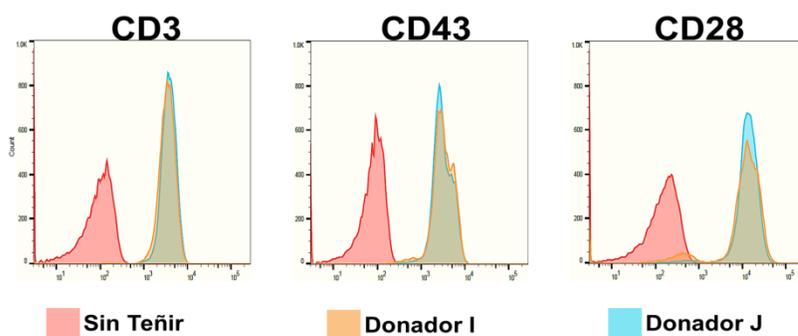
- 1) Se propone evaluar la vía de señalización inducida en respuesta a la estimulación por TCR+CD43+Cpn60.2 y compararla con la inducida por el estímulo TCR+CD43.
- 2) Se propone evaluar la expresión de CD43 en superficie en respuesta al estímulo TCR+CD43+Cpn60.2 y compararla con el estímulo TCR+CD43, con la finalidad de saber si Cpn60.2 regula la activación de los linfocitos por bloqueo en la formación de agregados.
- 3) Se propone evaluar la cantidad, tamaño y compactación de los agregados homo-típicos en respuesta al estímulo TCR+CD43+Cpn60.2 y compararla con el estímulo TCR+CD43.
- 4) Mediante microscopía de fluorescencia se propone evaluar la co-localización de CD43-LFA-1 o ICAM-1 en los agregados homo-típicos en respuesta al estímulo TCR+CD43+Cpn60.2 y compararla con el estímulo TCR+CD43,
- 5) Se propone evaluar la expresión de TGF- $\beta$ , IL-35, CTLA-4, TIM-3, ICOS, FOXP3 en respuesta al estímulo TCR+CD43+Cpn60.2 y compararla con el estímulo TCR+CD43. Esto nos permitirá definir si el efecto inhibitorio es por un factor soluble o bien contacto dependiente.
- 6) Se propone evaluar si el estímulo TCR+CD43+Cpn60.2 induce iTregs o si proliferan las Treg existentes, asimismo, se propone evaluar la funcionalidad de estos linfocitos T y compararla con el estímulo TCR+CD43. Esto porque se ha observado que, en modelos murinos de sepsis, la deficiencia de CD43 impacta en el número de Tregs y la supervivencia de

los ratones (Fay *et al.* 2018). Se desconoce el papel de CD43 en estas células.

- 7) Se propone evaluar el efecto de los linfocitos T estimulados por TCR+CD43+Cpn60.2, sobre la función de macrófagos infectados por Mtb (co-cultivos o los sobrenadantes de estos linfocitos T) y compararla con el estímulo TCR+CD43
- 8) Se propone evaluar cómo impacta la transferencia de los linfocitos T estimulados por TCR+CD43+Cpn60.2, a ratones infectados por Mtb y compararla con la transferencia de los linfocitos T estimulados por TCR+CD43.
- 9) Se propone cuantificar los niveles de Cpn60.2 en los sobrenadantes de pulmones de ratones infectados por Mtb, así como en el BALF de pacientes con tuberculosis. Esto dará significado e importancia biológica a los experimentos realizados con los linfocitos T.

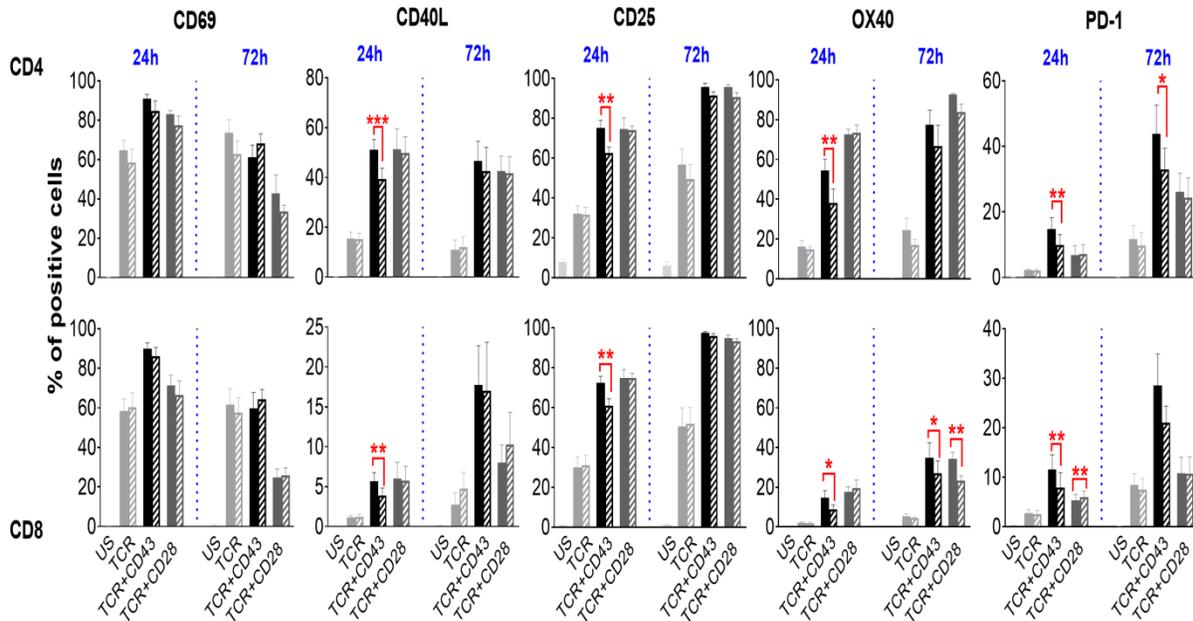
## APENDICE

### Figuras suplementarias



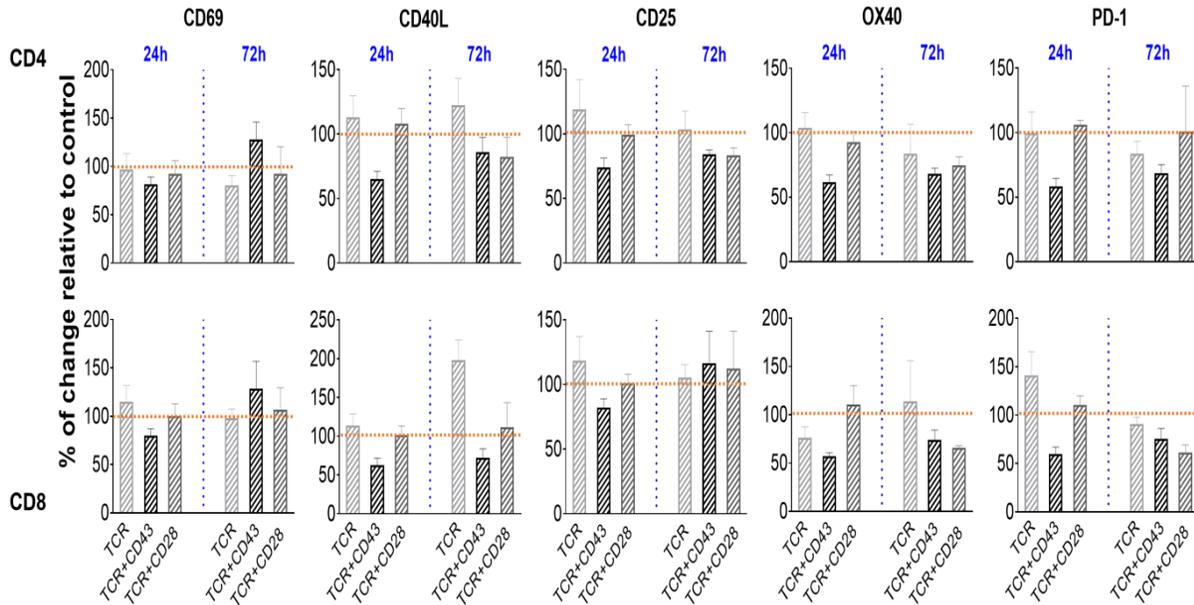
Donadores	%CD3+
A	98.8
B	98.5
C	99.1
D	99.9
E	99.6
F	99.2
G	95.7
H	95.7
I	99
J	98.6
K	99.1
L	99.3

**Figura S1. Pureza de los linfocitos T aislados.** Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD3, CD43 y CD28 de dos donadores. La expresión de dichos marcadores fue evaluada mediante citometría de flujo. La tabla muestra los porcentajes de expresión de CD3 en los linfocitos T purificados de cada uno de los donadores empleados para los experimentos.



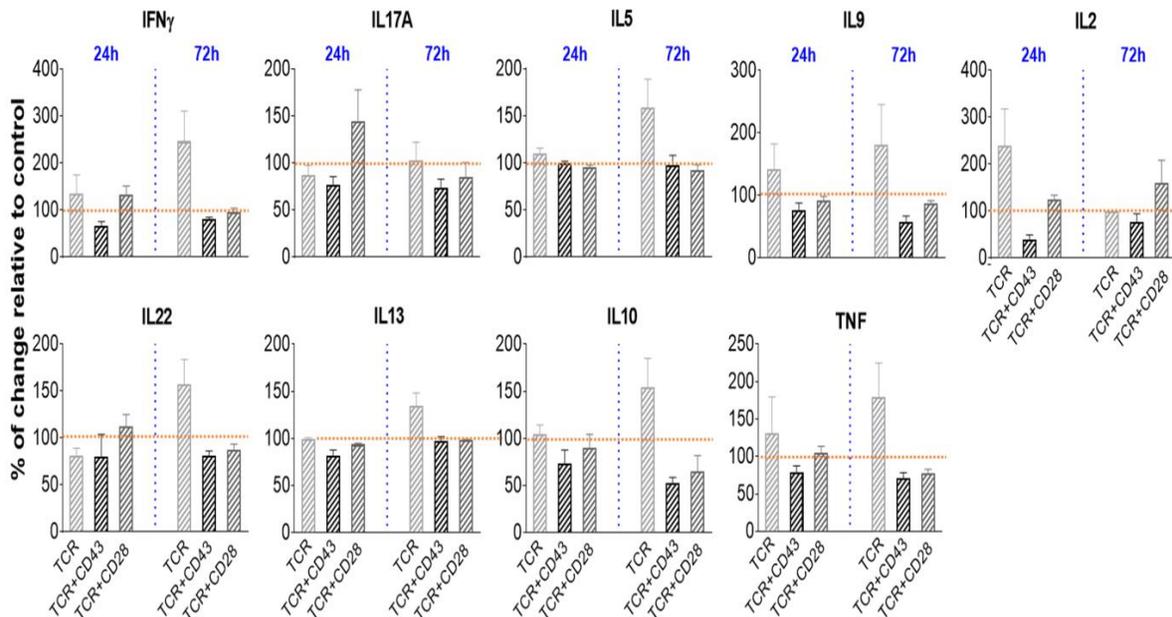
**Figura S2. Cpn60.2 impacta negativamente en el estado de activación temprana y tardía de los linfocitos T estimulados en presencia de TCR+CD43.**

Las gráficas muestran el porcentaje de expresión de CD69, CD40L, CD25, OX40 y PD-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tras la estimulación con TCR ± CD28/CD43 ± Cpn60.2 por 24 y 72 horas. Los datos mostrados representan el promedio de 12 donadores independientes ± SEM. (Barras con relleno sólido activación sin Cpn60.2; barras con relleno de patrón activación con Cpn60.2). \*\*\*p<0.005, \*\*p<0.01, \*p<0.05, prueba pareada de t-student de dos colas.

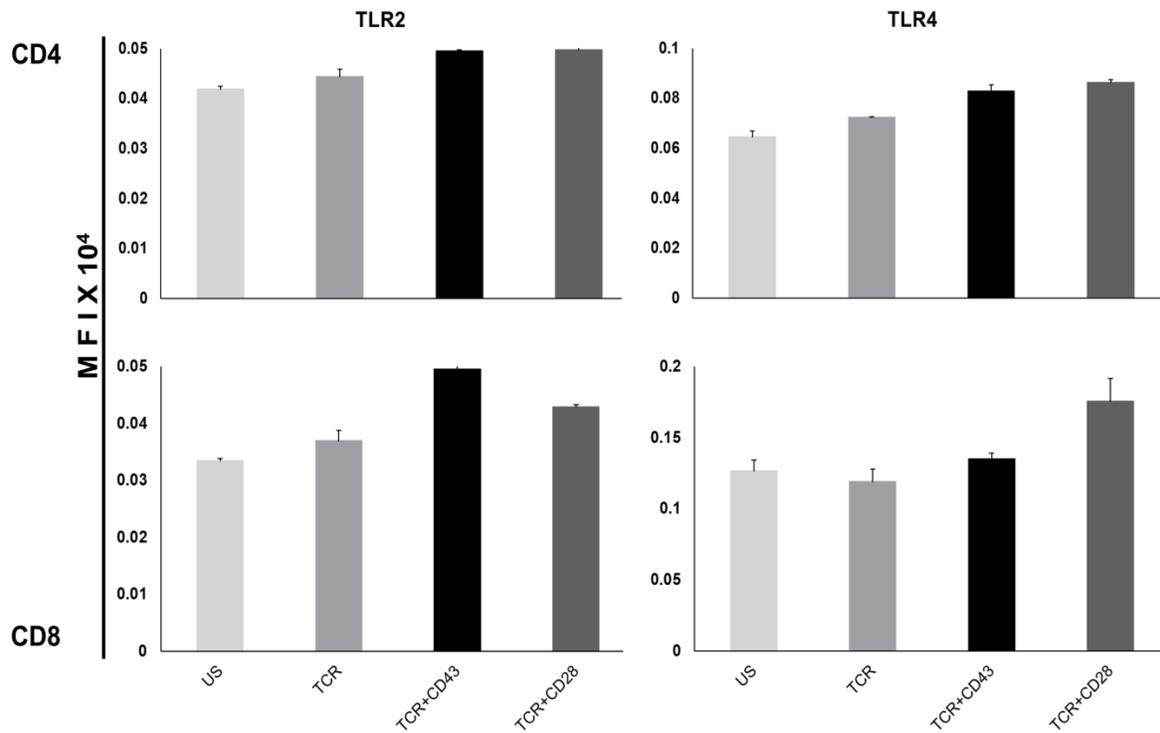


**Figura S3. Cpn60.2 impacta negativamente en el estado de activación temprana y tardía de los linfocitos T estimulados en presencia de TCR+CD43.**

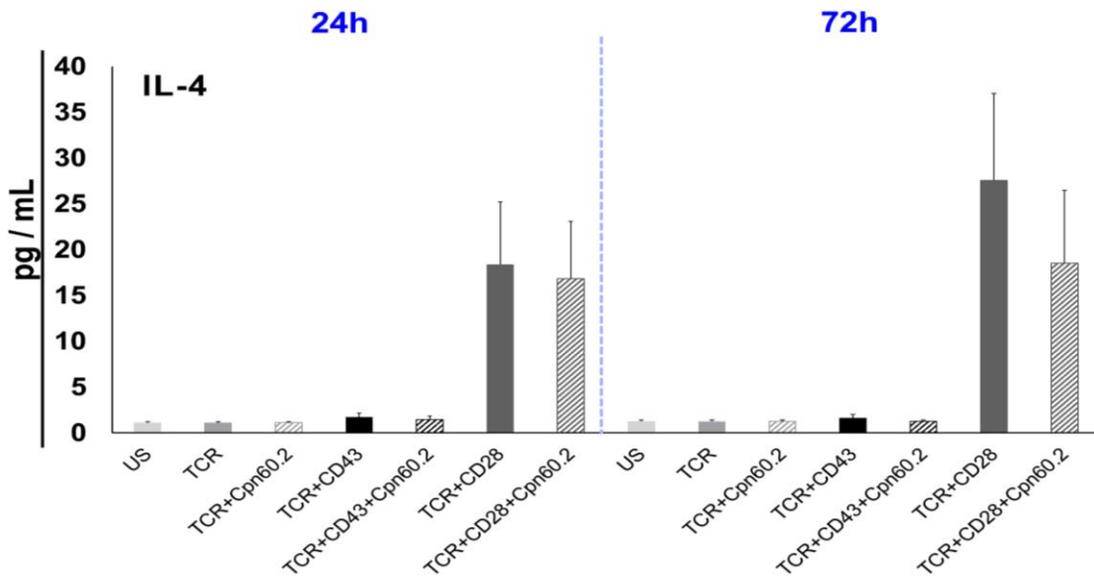
Las gráficas muestran el porcentaje de cambio en los niveles de expresión de cada marcador tras la estimulación con TCR ± CD28/CD43 + Cpn60.2, respecto al nivel de expresión observado para cada estímulo en ausencia de Cpn60.2 (n=12; 24 y 72h)



**Figura S4. Cpn60.2 impacta negativamente en la capacidad de producción de citocinas de los linfocitos T estimulados en presencia de TCR+CD43.** Las gráficas muestran el porcentaje de cambio en los niveles de expresión de cada citocina tras la estimulación con TCR  $\pm$  CD28/CD43 + Cpn60.2, respecto al nivel de expresión observado para cada estímulo en ausencia de Cpn60.2 (n=12; 24 y 72h)



**Figura S5. Los linfocitos T humanos expresan TLR2 y TLR4.** Las gráficas de barras muestran la expresión de TLR2 y TLR4 en linfocitos T activados por TCR±coestimuladores durante 24 horas. US, células cultivadas en RPMI. MFI promedio de 2 donadores independientes±SEM.



**Figura S6. La producción de IL-4 ocurre solo en respuesta al estímulo TCR+CD28.** Los sobrenadantes de cultivo de los linfocitos T activados por TCR±coestimuladores, en presencia o ausencia de Cpn60.2, como se describe en la Fig. 6, fueron recolectados a las 24 ó 72 horas y la concentración de citocinas fue evaluada por un ensayo multiplex. Concentración de IL-4. Barras con relleno sólido: activación sin Cpn60.2; barras con relleno de patrón: activación con Cpn60.2. US, sobrenadante de células cultivadas en RPMI. Promedio de 12 donadores independientes ± SEM.

## **REFERENCIAS**

- Acuto, O. and F. Michel (2003). "CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling." Nat Rev Immunol **3**(12): 939-951.
- Alcaide, P., S. L. King, C. J. Dimitroff, Y. C. Lim, R. C. Fuhlbrigge and F. W. Luscinckas (2007). "The 130-kDa glycoform of CD43 functions as an E-selectin ligand for activated Th1 cells in vitro and in delayed-type hypersensitivity reactions in vivo." J Invest Dermatol **127**(8): 1964-1972.
- Alder, G. M., B. M. Austen, C. L. Bashford, A. Mehlert and C. A. Pasternak (1990). "Heat shock proteins induce pores in membranes." Biosci Rep **10**(6): 509-518.
- Amakata, Y., Y. Fujiyama, A. Andoh, K. Hodohara and T. Bamba (2001). "Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes." Clin Exp Immunol **124**(2): 214-222.
- Anbarasu, D., C. P. Raja and A. Raja (2013). "Multiplex analysis of cytokines/chemokines as biomarkers that differentiate healthy contacts from tuberculosis patients in high endemic settings." Cytokine **61**(3): 747-754.
- Andre, P., K. S. Prasad, C. V. Denis, M. He, J. M. Papalia, R. O. Hynes, D. R. Phillips and D. D. Wagner (2002). "CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism." Nat Med **8**(3): 247-252.
- Arenas-Ramirez, N., J. Woytschak and O. Boyman (2015). "Interleukin-2: Biology, Design and Application." Trends Immunol **36**(12): 763-777.
- Asano, T., Y. Meguri, T. Yoshioka, Y. Kishi, M. Iwamoto, M. Nakamura, Y. Sando, H. Yagita, J. Koreth, H. T. Kim, E. P. Alyea, P. Armand, C. S. Cutler, V. T. Ho, J. H. Antin, R. J. Soiffer, Y. Maeda, M. Tanimoto, J. Ritz and K. I. Matsuoka (2017). "PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy." Blood **129**(15): 2186-2197.
- Babu, S., S. Q. Bhat, N. P. Kumar, S. Jayantasri, S. Rukmani, P. Kumaran, P. G. Gopi, C. Kolappan, V. Kumaraswami and T. B. Nutman (2009). "Human type 1 and 17 responses in latent tuberculosis are modulated by coincident filarial infection through cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and programmed death-1." J Infect Dis **200**(2): 288-298.
- Bankovich, A. J., L. R. Shioh and J. G. Cyster (2010). "CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4." J Biol Chem **285**(29): 22328-22337.
- Bansal-Pakala, P., B. S. Halteman, M. H. Cheng and M. Croft (2004). "Costimulation of CD8 T cell responses by OX40." J Immunol **172**(8): 4821-4825.
- Bernal-Fernandez, G., P. Espinosa-Cueto, R. Leyva-Meza, N. Mancilla and R. Mancilla (2010). "Decreased expression of T-cell costimulatory molecule CD28 on CD4 and CD8 T cells of mexican patients with pulmonary tuberculosis." Tuberc Res Treat **2010**: 517547.
- Bezuidenhout, J., T. Roberts, L. Muller, P. van Helden and G. Walzl (2009). "Pleural tuberculosis in patients with early HIV infection is associated with

increased TNF-alpha expression and necrosis in granulomas." PLoS One **4**(1): e4228.

Bhatt, K., A. Uzelac, S. Mathur, A. McBride, J. Potian and P. Salgame (2009). "B7 costimulation is critical for host control of chronic Mycobacterium tuberculosis infection." J Immunol **182**(6): 3793-3800.

Boisson-Dupuis, S., J. El Baghdadi, N. Parvaneh, A. Bousfiha, J. Bustamante, J. Feinberg, A. Samarina, A. V. Grant, L. Janniere, N. El Hafidi, A. Hassani, D. Nolan, J. Najib, Y. Camcioglu, N. Hatipoglu, C. Aydogmus, G. Tanir, C. Aytekin, M. Keser, A. Somer, G. Aksu, N. Kutukculer, D. Mansouri, A. Mahdavian, S. Mamishi, A. Alcais, L. Abel and J. L. Casanova (2011). "IL-12Rbeta1 deficiency in two of fifty children with severe tuberculosis from Iran, Morocco, and Turkey." PLoS One **6**(4): e18524.

Bold, T. D. and J. D. Ernst (2012). "CD4+ T cell-dependent IFN-gamma production by CD8+ effector T cells in Mycobacterium tuberculosis infection." J Immunol **189**(5): 2530-2536.

Boom, W. H., D. H. Canaday, S. A. Fulton, A. J. Gehring, R. E. Rojas and M. Torres (2003). "Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing." Tuberculosis (Edinb) **83**(1-3): 98-106.

Booty, M. G., P. Barreira-Silva, S. M. Carpenter, C. Nunes-Alves, M. K. Jacques, B. L. Stowell, P. Jayaraman, G. Beamer and S. M. Behar (2016). "IL-21 signaling is essential for optimal host resistance against Mycobacterium tuberculosis infection." Sci Rep **6**: 36720.

Borriello, F., M. P. Sethna, S. D. Boyd, A. N. Schweitzer, E. A. Tivol, D. Jacoby, T. B. Strom, E. M. Simpson, G. J. Freeman and A. H. Sharpe (1997). "B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation." Immunity **6**(3): 303-313.

Boyman, O. and J. Sprent (2012). "The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system." Nat Rev Immunol **12**(3): 180-190.

Bravo-Adame, M. E., R. Vera-Estrella, B. J. Barkla, C. Martinez-Campos, A. Flores-Alcantar, J. P. Ocelotl-Oviedo, G. Pedraza-Alva and Y. Rosenstein (2017). "An alternative mode of CD43 signal transduction activates pro-survival pathways of T lymphocytes." Immunology **150**(1): 87-99.

Brusko, T. M., C. H. Wasserfall, M. A. Hulme, R. Cabrera, D. Schatz and M. A. Atkinson (2009). "Influence of membrane CD25 stability on T lymphocyte activity: implications for immunoregulation." PLoS One **4**(11): e7980.

Bulut, Y., K. S. Michelsen, L. Hayrapetian, Y. Naiki, R. Spallek, M. Singh and M. Arditì (2005). "Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals." J Biol Chem **280**(22): 20961-20967.

Cabrera, R., M. Ararat, M. Cao, Y. Xu, C. Wasserfall, M. A. Atkinson, C. Liu and D. R. Nelson (2010). "Hepatocellular carcinoma immunopathogenesis: clinical evidence for global T cell defects and an immunomodulatory role for soluble CD25 (sCD25)." Dig Dis Sci **55**(2): 484-495.

Campo, M., A. K. Randhawa, S. Dunstan, J. Farrar, M. Caws, N. D. Bang, N. N. Lan, T. T. Hong Chau, D. J. Horne, N. T. Thuong, G. E. Thwaites and T. R. Hawn

(2015). "Common polymorphisms in the CD43 gene region are associated with tuberculosis disease and mortality." Am J Respir Cell Mol Biol **52**(3): 342-348.

Cannon, J. L., A. Collins, P. D. Mody, D. Balachandran, K. J. Henriksen, C. E. Smith, J. Tong, B. S. Clay, S. D. Miller and A. I. Sperling (2008). "CD43 regulates Th2 differentiation and inflammation." J Immunol **180**(11): 7385-7393.

Caragol, I., M. Raspall, C. Fieschi, J. Feinberg, M. N. Larrosa, M. Hernandez, C. Figueras, J. M. Bertran, J. L. Casanova and T. Espanol (2003). "Clinical tuberculosis in 2 of 3 siblings with interleukin-12 receptor beta1 deficiency." Clin Infect Dis **37**(2): 302-306.

Carbone, E., G. Ruggiero, G. Terrazzano, C. Palomba, C. Manzo, S. Fontana, H. Spits, K. Karre and S. Zappacosta (1997). "A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction." J Exp Med **185**(12): 2053-2060.

Casamayor-Palleja, M., M. Khan and I. C. MacLennan (1995). "A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex." J Exp Med **181**(4): 1293-1301.

Castellanos, M. C., C. Munoz, M. C. Montoya, E. Lara-Pezzi, M. Lopez-Cabrera and M. O. de Landazuri (1997). "Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1." J Immunol **159**(11): 5463-5473.

Cehovin, A., A. R. Coates, Y. Hu, Y. Riffo-Vasquez, P. Tormay, C. Botanch, F. Altare and B. Henderson (2010). "Comparison of the moonlighting actions of the two highly homologous chaperonin 60 proteins of Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **78**(7): 3196-3206.

Clifford, V., C. Zufferey, A. Street, J. Denholm, M. Tebruegge and N. Curtis (2015). "Cytokines for monitoring anti-tuberculous therapy: A systematic review." Tuberculosis (Edinb) **95**(3): 217-228.

Coates, A. R., A. Cehovin and Y. Hu (2008). "Chaperonin 60 and macrophage activation." Novartis Found Symp **291**: 160-169; discussion 169-172, 221-164.

Compton, H. L. and J. P. Farrell (2002). "CD28 costimulation and parasite dose combine to influence the susceptibility of BALB/c mice to infection with Leishmania major." J Immunol **168**(3): 1302-1308.

Constant, P., F. Davodeau, M. A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville and J. J. Fournie (1994). "Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands." Science **264**(5156): 267-270.

Cooper, A. M., D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell and I. M. Orme (1993). "Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice." J Exp Med **178**(6): 2243-2247.

Corbett, E. L., C. J. Watt, N. Walker, D. Maher, B. G. Williams, M. C. Raviglione and C. Dye (2003). "The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic." Arch Intern Med **163**(9): 1009-1021.

Coulter, F., A. Parrish, D. Manning, B. Kampmann, J. Mendy, M. Garand, D. M. Lewinsohn, E. M. Riley and J. S. Sutherland (2017). "IL-17 Production from T

Helper 17, Mucosal-Associated Invariant T, and gammadelta Cells in Tuberculosis Infection and Disease." Front Immunol **8**: 1252.

Cozmei, C., D. Constantinescu, E. Carasevici, E. Anisie, D. Ungureanu, A. Sorete-Arbore, D. Gramada, T. Mihaescu, C. Croitoru and D. Popa (2007). "Th1 and Th2 cytokine response in patients with pulmonary tuberculosis and health care workers occupationally exposed to M. tuberculosis." Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi **111**(3): 702-709.

Cruz-Adalia, A., L. J. Jimenez-Borreguero, M. Ramirez-Huesca, I. Chico-Calero, O. Barreiro, E. Lopez-Conesa, M. Fresno, F. Sanchez-Madrid and P. Martin (2010). "CD69 limits the severity of cardiomyopathy after autoimmune myocarditis." Circulation **122**(14): 1396-1404.

Cruz, A., A. G. Fraga, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, E. Torrado, M. Saraiva, D. R. Pereira, T. D. Randall, J. Pedrosa, A. M. Cooper and A. G. Castro (2010). "Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis." J Exp Med **207**(8): 1609-1616.

Cruz, A., S. A. Khader, E. Torrado, A. Fraga, J. E. Pearl, J. Pedrosa, A. M. Cooper and A. G. Castro (2006). "Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection." J Immunol **177**(3): 1416-1420.

Chavez-Galan, L., J. Illescas-Eugenio, M. Alvarez-Sekely, R. Baez-Saldana, R. Chavez and R. Lascurain (2019). "Tuberculosis patients display a high proportion of CD8(+) T cells with a high cytotoxic potential." Microbiol Immunol **63**(8): 316-327.

Chen, Z. Y., L. Wang, L. Gu, R. Qu, D. B. Lowrie, Z. Hu, W. Sha and X. Y. Fan (2020). "Decreased Expression of CD69 on T Cells in Tuberculosis Infection Resisters." Front Microbiol **11**: 1901.

Cheng, Z., B. Taylor, D. R. Ourthiague and A. Hoffmann (2015). "Distinct single-cell signaling characteristics are conferred by the MyD88 and TRIF pathways during TLR4 activation." Sci Signal **8**(385): ra69.

Chiacchio, T., R. Casetti, O. Butera, V. Vanini, S. Carrara, E. Girardi, D. Di Mitri, L. Battistini, F. Martini, G. Borsellino and D. Goletti (2009). "Characterization of regulatory T cells identified as CD4(+)CD25(high)CD39(+) in patients with active tuberculosis." Clin Exp Immunol **156**(3): 463-470.

Damoiseaux, J. (2020). "The IL-2 - IL-2 receptor pathway in health and disease: The role of the soluble IL-2 receptor." Clin Immunol **218**: 108515.

de la Fuente, H., A. Cruz-Adalia, G. Martinez Del Hoyo, D. Cibrian-Vera, P. Bonay, D. Perez-Hernandez, J. Vazquez, P. Navarro, R. Gutierrez-Gallego, M. Ramirez-Huesca, P. Martin and F. Sanchez-Madrid (2014). "The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1." Mol Cell Biol **34**(13): 2479-2487.

de Smet, W., H. Walter and L. van Hove (1993). "A new CD43 monoclonal antibody induces homotypic aggregation of human leucocytes through a CD11a/CD18-dependent and -independent mechanism." Immunology **79**(1): 46-54.

Dhanasekaran, S., S. Jenum, R. Stavrum, C. Ritz, D. Faurholt-Jepsen, J. Kenneth, M. Vaz, H. M. Grewal and T. M. Doherty (2013). "Identification of biomarkers for

Mycobacterium tuberculosis infection and disease in BCG-vaccinated young children in Southern India." Genes Immun **14**(6): 356-364.

Dhiman, R., M. Indramohan, P. F. Barnes, R. C. Nayak, P. Paidipally, L. V. Rao and R. Vankayalapati (2009). "IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of Mycobacterium tuberculosis by enhancing phagolysosomal fusion." J Immunol **183**(10): 6639-6645.

Dhiman, R., S. Venkatasubramanian, P. Paidipally, P. F. Barnes, A. Tvinnereim and R. Vankayalapati (2014). "Interleukin 22 inhibits intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis by enhancing calgranulin A expression." J Infect Dis **209**(4): 578-587.

Domingo-Gonzalez, R., O. Prince, A. Cooper and S. A. Khader (2016). "Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection." Microbiol Spectr **4**(5).

Dorman, S. E., C. Picard, D. Lammas, K. Heyne, J. T. van Dissel, R. Baretto, S. D. Rosenzweig, M. Newport, M. Levin, J. Roesler, D. Kumararatne, J. L. Casanova and S. M. Holland (2004). "Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies." Lancet **364**(9451): 2113-2121.

Durai, M., R. S. Gupta and K. D. Moudgil (2004). "The T cells specific for the carboxyl-terminal determinants of self (rat) heat-shock protein 65 escape tolerance induction and are involved in regulation of autoimmune arthritis." J Immunol **172**(5): 2795-2802.

Ehlers, S. and U. E. Schaible (2012). "The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion." Front Immunol **3**: 411.

Engers, H. D., B. R. Bloom and T. Godal (1985). "Monoclonal antibodies against mycobacterial antigens." Immunol Today **6**(12): 345-348.

Eribo, O. A., M. S. Leqheka, S. T. Malherbe, S. McAnda, K. Stanley, G. D. van der Spuy, G. Walzl and N. N. Chegou (2020). "Host urine immunological biomarkers as potential candidates for the diagnosis of tuberculosis." Int J Infect Dis **99**: 473-481.

Esplugues, E., D. Sancho, J. Vega-Ramos, C. Martinez, U. Syrbe, A. Hamann, P. Engel, F. Sanchez-Madrid and P. Lauzurica (2003). "Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69." J Exp Med **197**(9): 1093-1106.

Eum, S. Y., B. Y. Jeon, J. H. Min, S. C. Kim, S. Cho, S. K. Park and S. N. Cho (2008). "Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 in whole blood is associated with disease progression in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis patients." Respiration **76**(3): 331-337.

Fay, K. T., D. B. Chihade, C. W. Chen, N. J. Klingensmith, J. D. Lyons, K. Ramonell, Z. Liang, C. M. Coopersmith and M. L. Ford (2018). "Increased mortality in CD43-deficient mice during sepsis." PLoS One **13**(9): e0202656.

Ferguson, S. E., S. Han, G. Kelsoe and C. B. Thompson (1996). "CD28 is required for germinal center formation." J Immunol **156**(12): 4576-4581.

Fierro, N. A., G. Pedraza-Alva and Y. Rosenstein (2006). "TCR-dependent cell response is modulated by the timing of CD43 engagement." J Immunol **176**(12): 7346-7353.

Flores-Batista, V. C., N. Boechat, P. M. Lago, L. C. Lazzarini, L. R. Pessanha, A. S. Almeida, T. T. Mafort, A. L. Kritski, J. L. Ho and J. R. Lapa-e-Silva (2007). "Low

expression of antigen-presenting and costimulatory molecules by lung cells from tuberculosis patients." Braz J Med Biol Res **40**(12): 1671-1679.

Flynn, J. L. and J. Chan (2001). "Immunology of tuberculosis." Annu Rev Immunol **19**: 93-129.

Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart and B. R. Bloom (1993). "An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection." J Exp Med **178**(6): 2249-2254.

Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak and B. R. Bloom (1995). "Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice." Immunity **2**(6): 561-572.

Francisco, L. M., P. T. Sage and A. H. Sharpe (2010). "The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity." Immunol Rev **236**: 219-242.

Fratazzi, C., N. Manjunath, R. D. Arbeit, C. Carini, T. A. Gerken, B. Ardman, E. Remold-O'Donnell and H. G. Remold (2000). "A macrophage invasion mechanism for mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43." J Exp Med **192**(2): 183-192.

Freire-de-Lima, L., F. Alisson-Silva, S. T. Carvalho, C. M. Takiya, M. M. Rodrigues, G. A. DosReis, L. Mendonca-Previato, J. O. Previato and A. R. Todeschini (2010). "Trypanosoma cruzi subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8+ T cell responses." J Biol Chem **285**(18): 13388-13396.

Frentsch, M., R. Stark, N. Matzmohr, S. Meier, S. Durlanik, A. R. Schulz, U. Stervbo, K. Jurchott, F. Gebhardt, G. Heine, M. A. Reuter, M. R. Betts, D. Busch and A. Thiel (2013). "CD40L expression permits CD8+ T cells to execute immunologic helper functions." Blood **122**(3): 405-412.

Frieden, T. R., T. R. Sterling, S. S. Munsiff, C. J. Watt and C. Dye (2003). "Tuberculosis." Lancet **362**(9387): 887-899.

Fu, Y., Q. Lin, Z. Zhang and L. Zhang (2020). "Therapeutic strategies for the costimulatory molecule OX40 in T-cell-mediated immunity." Acta Pharm Sin B **10**(3): 414-433.

Fukuda, M. (2002). "Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion." Biochim Biophys Acta **1573**(3): 394-405.

Fulcher, J. A., M. H. Chang, S. Wang, T. Almazan, S. T. Hashimi, A. U. Eriksson, X. Wen, M. Pang, L. G. Baum, R. R. Singh and B. Lee (2009). "Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and protein kinase C signaling." J Biol Chem **284**(39): 26860-26870.

Galindo-Albarran, A. O., O. Ramirez-Pliego, R. G. Labastida-Conde, E. I. Melchyperez, A. Liquitaya-Montiel, F. R. Esquivel-Guadarrama, G. Rosas-Salgado, Y. Rosenstein and M. A. Santana (2014). "CD43 signals prepare human T cells to receive cytokine differentiation signals." J Cell Physiol **229**(2): 172-180.

Garcia-Diaz, A., D. S. Shin, B. H. Moreno, J. Saco, H. Escuin-Ordinas, G. A. Rodriguez, J. M. Zaretsky, L. Sun, W. Hugo, X. Wang, G. Parisi, C. P. Saus, D. Y. Torrejon, T. G. Graeber, B. Comin-Anduix, S. Hu-Lieskovan, R. Damoiseaux, R. S. Lo and A. Ribas (2017). "Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression." Cell Rep **19**(6): 1189-1201.

Garcia-Laorden, M. I., D. C. Blok, L. M. Kager, A. J. Hoogendijk, G. J. van Mierlo, I. O. Lede, W. Rahman, R. Afroz, A. Ghose, C. E. Visser, A. S. Md Zahed, M. A. Husain, K. M. Alam, P. Chandra Barua, M. Hassan, A. Hossain, M. A. Tayab, N. Day, A. M. Dondorp, A. F. de Vos and T. van der Poll (2015). "Increased intra- and extracellular granzyme expression in patients with tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **95**(5): 575-580.

Gauchat, J. F., S. Henchoz, D. Fattah, G. Mazzei, J. P. Aubry, T. Jomotte, L. Dash, K. Page, R. Solari, D. Aldebert and et al. (1995). "CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils." Eur J Immunol **25**(3): 863-865.

Gauchat, J. F., S. Henchoz, G. Mazzei, J. P. Aubry, T. Brunner, H. Blasey, P. Life, D. Talabot, L. Flores-Romo, J. Thompson and et al. (1993). "Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils." Nature **365**(6444): 340-343.

Giampietro, F., J. H. de Waard, B. Rivas-Santiago, J. A. Enciso-Moreno, A. Salgado and Z. Araujo (2010). "In vitro levels of cytokines in response to purified protein derivative (PPD) antigen in a population with high prevalence of pulmonary tuberculosis." Hum Immunol **71**(11): 1099-1104.

Gonzalez-Amaro, R., J. R. Cortes, F. Sanchez-Madrid and P. Martin (2013). "Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?" Trends Mol Med **19**(10): 625-632.

Gorabi, A. M., S. Hajighasemi, N. Kiaie, S. M. Gheibi Hayat, T. Jamialahmadi, T. P. Johnston and A. Sahebkar (2020). "The pivotal role of CD69 in autoimmunity." J Autoimmun **111**: 102453.

Gramaglia, I., A. Jember, S. D. Pippig, A. D. Weinberg, N. Killeen and M. Croft (2000). "The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion." J Immunol **165**(6): 3043-3050.

Gramaglia, I., A. D. Weinberg, M. Lemon and M. Croft (1998). "Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses." J Immunol **161**(12): 6510-6517.

Green, A. M., R. Difazio and J. L. Flynn (2013). "IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection." J Immunol **190**(1): 270-277.

Guillon, A., Y. Jouan, D. Brea, F. Gueugnon, E. Dalloneau, T. Baranek, C. Henry, E. Morello, J. C. Renauld, M. Pichavant, P. Gosset, Y. Courty, P. Diot and M. Si-Tahar (2015). "Neutrophil proteases alter the interleukin-22-receptor-dependent lung antimicrobial defence." Eur Respir J **46**(3): 771-782.

Gutcher, I. and B. Becher (2007). "APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation." J Clin Invest **117**(5): 1119-1127.

Gutierrez, M. G., S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo and V. Deretic (2004). "Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages." Cell **119**(6): 753-766.

Han, Y., D. Liu and L. Li (2020). "PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer." Am J Cancer Res **10**(3): 727-742.

Harisinghani, M. G., T. C. McCloud, J. A. Shepard, J. P. Ko, M. M. Shroff and P. R. Mueller (2000). "Tuberculosis from head to toe." Radiographics **20**(2): 449-470; quiz 528-449, 532.

Harris, J., S. A. De Haro, S. S. Master, J. Keane, E. A. Roberts, M. Delgado and V. Deretic (2007). "T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*." Immunity **27**(3): 505-517.

Harris, J. and J. Keane (2010). "How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity." Clin Exp Immunol **161**(1): 1-9.

Hartshorn, K. L., L. S. Liou, M. R. White, M. M. Kazhdan, J. L. Tauber and A. I. Tauber (1995). "Neutrophil deactivation by influenza A virus. Role of hemagglutinin binding to specific sialic acid-bearing cellular proteins." J Immunol **154**(8): 3952-3960.

Hasegawa, A., C. Iwamura, M. Kitajima, K. Hashimoto, K. Otsuyama, H. Ogino, T. Nakayama and M. Shirai (2013). "Crucial role for CD69 in the pathogenesis of dextran sulphate sodium-induced colitis." PLoS One **8**(6): e65494.

He, J., Y. Hu, M. Hu and B. Li (2015). "Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer." Sci Rep **5**: 13110.

Heitmann, L., M. Abad Dar, T. Schreiber, H. Erdmann, J. Behrends, A. N. McKenzie, F. Brombacher, S. Ehlers and C. Holscher (2014). "The IL-13/IL-4/alpha axis is involved in tuberculosis-associated pathology." J Pathol **234**(3): 338-350.

Henn, V., J. R. Slupsky, M. Grafe, I. Anagnostopoulos, R. Forster, G. Muller-Berghaus and R. A. Kroczeck (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." Nature **391**(6667): 591-594.

Hernandez-Pando, R., L. Pavon, K. Arriaga, H. Orozco, V. Madrid-Marina and G. Rook (1997). "Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection." Infect Immun **65**(8): 3317-3327.

Hernandez, J. D., J. T. Nguyen, J. He, W. Wang, B. Ardman, J. M. Green, M. Fukuda and L. G. Baum (2006). "Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death." J Immunol **177**(8): 5328-5336.

Herzmann, C., M. Ernst, S. Ehlers, S. Stenger, J. Maertzdorf, G. Sotgiu and C. Lange (2012). "Increased frequencies of pulmonary regulatory T-cells in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection." Eur Respir J **40**(6): 1450-1457.

Hickey, T. B., L. M. Thorson, D. P. Speert, M. Daffe and R. W. Stokes (2009). "*Mycobacterium tuberculosis* Cpn60.2 and DnaK are located on the bacterial surface, where Cpn60.2 facilitates efficient bacterial association with macrophages." Infect Immun **77**(8): 3389-3401.

Hickey, T. B., H. J. Ziltener, D. P. Speert and R. W. Stokes (2010). "*Mycobacterium tuberculosis* employs Cpn60.2 as an adhesin that binds CD43 on the macrophage surface." Cell Microbiol **12**(11): 1634-1647.

Hirsch, C. S., R. Rojas, M. Wu and Z. Toossi (2016). "*Mycobacterium tuberculosis* Induces Expansion of Foxp3 Positive CD4 T-cells with a Regulatory Profile in

Tuberculin Non-sensitized Healthy Subjects: Implications for Effective Immunization against TB." J Clin Cell Immunol **7**(3).

Hochweller, K. and S. M. Anderton (2005). "Kinetics of costimulatory molecule expression by T cells and dendritic cells during the induction of tolerance versus immunity in vivo." Eur J Immunol **35**(4): 1086-1096.

Hogan, L. H., W. Markofski, A. Bock, B. Barger, J. D. Morrissey and M. Sandor (2001). "Mycobacterium bovis BCG-induced granuloma formation depends on gamma interferon and CD40 ligand but does not require CD28." Infect Immun **69**(4): 2596-2603.

Hossain, M. M. and M. N. Norazmi (2013). "Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection--the double-edged sword?" Biomed Res Int **2013**: 179174.

Hougardy, J. M., S. Place, M. Hildebrand, A. Drowart, A. S. Debie, C. Loch and F. Mascart (2007). "Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **176**(4): 409-416.

Hu, C. Y., X. A. Zhang, C. G. Meyer, T. Thye, W. Liu and W. C. Cao (2015). "Polymorphism of X-linked CD40 ligand gene associated with pulmonary tuberculosis in the Han Chinese population." Genes Immun **16**(6): 399-404.

Hu, Y., B. Henderson, P. A. Lund, P. Tormay, M. T. Ahmed, S. S. Gurcha, G. S. Besra and A. R. Coates (2008). "A Mycobacterium tuberculosis mutant lacking the groEL homologue cpn60.1 is viable but fails to induce an inflammatory response in animal models of infection." Infect Immun **76**(4): 1535-1546.

Hur, Y. G., Y. A. Kang, S. H. Jang, J. Y. Hong, A. Kim, S. A. Lee, Y. Kim and S. N. Cho (2015). "Adjunctive biomarkers for improving diagnosis of tuberculosis and monitoring therapeutic effects." J Infect **70**(4): 346-355.

Jiang, H., H. Gong, Q. Zhang, J. Gu, L. Liang and J. Zhang (2017). "Decreased expression of perforin in CD8(+) T lymphocytes in patients with Mycobacterium tuberculosis infection and its potential value as a marker for efficacy of treatment." J Thorac Dis **9**(5): 1353-1360.

Jin, Q., L. Jiang, Q. Chen, X. Li, Y. Xu, X. Sun, Z. Zhao and L. Wei (2018). "Rapid flow cytometry-based assay for the evaluation of gammadelta T cell-mediated cytotoxicity." Mol Med Rep **17**(3): 3555-3562.

Joseph, S., A. Yuen, V. Singh and Z. Hmama (2017). "Mycobacterium tuberculosis Cpn60.2 (GroEL2) blocks macrophage apoptosis via interaction with mitochondrial mortalin." Biol Open **6**(4): 481-488.

Karnell, J. L., S. A. Rieder, R. Ettinger and R. Kolbeck (2019). "Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond." Adv Drug Deliv Rev **141**: 92-103.

Karpusas, M., Y. M. Hsu, J. H. Wang, J. Thompson, S. Lederman, L. Chess and D. Thomas (1995). "2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand." Structure **3**(10): 1031-1039.

Kaufmann, S. H., U. Vath, J. E. Thole, J. D. Van Embden and F. Emmrich (1987). "Enumeration of T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein." Eur J Immunol **17**(3): 351-357.

Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto and H. Kikutani (1994). "The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation." Immunity **1**(3): 167-178.

Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel and M. M. Braun (2001). "Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent." N Engl J Med **345**(15): 1098-1104.

Kelsall, B. L., E. Stuber, M. Neurath and W. Strober (1996). "Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses." Ann N Y Acad Sci **795**: 116-126.

Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cillee, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall and A. M. Cooper (2007). "IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge." Nat Immunol **8**(4): 369-377.

Khunkaewla, P., H. B. Schiller, W. Paster, V. Leksa, L. Cermak, L. Andera, V. Horejsi and H. Stockinger (2008). "LFA-1-mediated leukocyte adhesion regulated by interaction of CD43 with LFA-1 and CD147." Mol Immunol **45**(6): 1703-1711.

King, C. L., J. Xianli, C. H. June, R. Abe and K. P. Lee (1996). "CD28-deficient mice generate an impaired Th2 response to Schistosoma mansoni infection." Eur J Immunol **26**(10): 2448-2455.

Klug-Micu, G. M., S. Stenger, A. Sommer, P. T. Liu, S. R. Krutzik, R. L. Modlin and M. Fabri (2013). "CD40 ligand and interferon-gamma induce an antimicrobial response against Mycobacterium tuberculosis in human monocytes." Immunology **139**(1): 121-128.

Komai-Koma, M., D. S. Gilchrist and D. Xu (2009). "Direct recognition of LPS by human but not murine CD8+ T cells via TLR4 complex." Eur J Immunol **39**(6): 1564-1572.

Komai-Koma, M., L. Jones, G. S. Ogg, D. Xu and F. Y. Liew (2004). "TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3029-3034.

Kong, T. H., A. R. Coates, P. D. Butcher, C. J. Hickman and T. M. Shinnick (1993). "Mycobacterium tuberculosis expresses two chaperonin-60 homologs." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2608-2612.

Krinzman, S. J., G. T. De Sanctis, M. Cernadas, D. Mark, Y. Wang, J. Listman, L. Kobzik, C. Donovan, K. Nassr, I. Katona, D. C. Christiani, D. L. Perkins and P. W. Finn (1996). "Inhibition of T cell costimulation abrogates airway hyperresponsiveness in a murine model." J Clin Invest **98**(12): 2693-2699.

Kumar, N. P., K. Moideen, V. V. Banurekha, D. Nair, R. Sridhar, T. B. Nutman and S. Babu (2015). "IL-27 and TGFbeta mediated expansion of Th1 and adaptive regulatory T cells expressing IL-10 correlates with bacterial burden and disease severity in pulmonary tuberculosis." Immun Inflamm Dis **3**(3): 289-299.

Lamb, J. R., J. Ivanyi, A. D. Rees, J. B. Rothbard, K. Howland, R. A. Young and D. B. Young (1987). "Mapping of T cell epitopes using recombinant antigens and synthetic peptides." EMBO J **6**(5): 1245-1249.

Layseca-Espinosa, E., G. Pedraza-Alva, J. L. Montiel, R. del Rio, N. A. Fierro, R. Gonzalez-Amaro and Y. Rosenstein (2003). "T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide." J Leukoc Biol **74**(6): 1083-1093.

Leveille, C., M. Bouillon, W. Guo, J. Bolduc, E. Sharif-Askari, Y. El-Fakhry, C. Reyes-Moreno, R. Lapointe, Y. Merhi, J. A. Wilkins and W. Mourad (2007). "CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling." J Biol Chem **282**(8): 5143-5151.

Lewthwaite, J. C., A. R. Coates, P. Tormay, M. Singh, P. Mascagni, S. Poole, M. Roberts, L. Sharp and B. Henderson (2001). "Mycobacterium tuberculosis chaperonin 60.1 is a more potent cytokine stimulator than chaperonin 60.2 (Hsp 65) and contains a CD14-binding domain." Infect Immun **69**(12): 7349-7355.

Li, J., C. Jin, C. Wu and J. Huang (2019). "PD-1 modulating Mycobacterium tuberculosis-specific polarized effector memory T cells response in tuberculosis pleurisy." J Leukoc Biol **106**(3): 733-747.

Li, L., Y. Jiang, S. Lao, B. Yang, S. Yu, Y. Zhang and C. Wu (2016). "Mycobacterium tuberculosis-Specific IL-21+IFN-gamma+CD4+ T Cells Are Regulated by IL-12." PLoS One **11**(1): e0147356.

Li, L., D. Qiao, X. Fu, S. Lao, X. Zhang and C. Wu (2011). "Identification of M. tuberculosis-specific Th1 cells expressing CD69 generated in vivo in pleural fluid cells from patients with tuberculous pleurisy." PLoS One **6**(8): e23700.

Li, L., D. Qiao, X. Fu, S. Lao, X. Zhang and C. Wu (2011). "Identification of Mycobacterium tuberculosis-specific Th1, Th17 and Th22 cells using the expression of CD40L in tuberculous pleurisy." PLoS One **6**(5): e20165.

Li, L., B. Yang, X. Zhang, S. Lao and W. Changyou (2014). "Mycobacterium tuberculosis-specific polyfunctional cytotoxic CD8+ T cells express CD69." Tuberculosis (Edinb) **94**(3): 219-225.

Lin, C. R., T. Y. Wei, H. Y. Tsai, Y. T. Wu, P. Y. Wu and S. T. Chen (2015). "Glycosylation-dependent interaction between CD69 and S100A8/S100A9 complex is required for regulatory T-cell differentiation." FASEB J **29**(12): 5006-5017.

Lin, J. X. and W. J. Leonard (2019). "Fine-Tuning Cytokine Signals." Annu Rev Immunol **37**: 295-324.

Lindqvist, C. A., L. H. Christiansson, B. Simonsson, G. Enblad, U. Olsson-Stromberg and A. S. Loskog (2010). "T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies." Immunology **131**(3): 371-376.

Liu, C. H., H. Liu and B. Ge (2017). "Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion." Cell Mol Immunol **14**(12): 963-975.

Liu, Q., Q. Ou, L. Shen, C. Qiu, B. Zhang, W. Zhang, L. Shao, Y. Gao and Z. W. Chen (2019). "BATF Potentially Mediates Negative Regulation of PD-1/PD-Ls Pathway on T Cell Functions in Mycobacterium tuberculosis Infection." Front Immunol **10**: 2430.

Liu, X., F. Li, H. Niu, L. Ma, J. Chen, Y. Zhang, L. Peng, C. Gan, X. Ma and B. Zhu (2019). "IL-2 Restores T-Cell Dysfunction Induced by Persistent Mycobacterium tuberculosis Antigen Stimulation." Front Immunol **10**: 2350.

Lombard, R., E. Doz, F. Carreras, M. Epardaud, Y. Le Vern, D. Buzoni-Gatel and N. Winter (2016). "IL-17RA in Non-Hematopoietic Cells Controls CXCL-1 and 5 Critical to Recruit Neutrophils to the Lung of Mycobacteria-Infected Mice during the Adaptive Immune Response." PLoS One **11**(2): e0149455.

Lopez-Cabrera, M., E. Munoz, M. V. Blazquez, M. A. Ursa, A. G. Santis and F. Sanchez-Madrid (1995). "Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor-alpha-responsive elements." J Biol Chem **270**(37): 21545-21551.

Loubaki, L., A. Semlali, M. Boisvert, E. Jacques, S. Plante, F. Aoudjit, W. Mourad and J. Chakir (2010). "Crosstalk between T cells and bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects involves CD40L/alpha 5 beta 1 interaction." Mol Immunol **47**(11-12): 2112-2118.

Luheshi, N., G. Davies, E. Poon, K. Wiggins, M. McCourt and J. Legg (2014). "Th1 cytokines are more effective than Th2 cytokines at licensing anti-tumour functions in CD40-activated human macrophages in vitro." Eur J Immunol **44**(1): 162-172.

Ma, D. Y. and E. A. Clark (2009). "The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells." Semin Immunol **21**(5): 265-272.

Mackay, L. K., A. Braun, B. L. Macleod, N. Collins, C. Tebartz, S. Bedoui, F. R. Carbone and T. Gebhardt (2015). "Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention." J Immunol **194**(5): 2059-2063.

Madan-Lala, R., J. K. Sia, R. King, T. Adekambi, L. Monin, S. A. Khader, B. Pulendran and J. Rengarajan (2014). "Mycobacterium tuberculosis impairs dendritic cell functions through the serine hydrolase Hip1." J Immunol **192**(9): 4263-4272.

Mahan, C. S., J. J. Thomas, W. H. Boom and R. E. Rojas (2009). "CD4+ CD25(high) Foxp3+ regulatory T cells downregulate human Vdelta2+ T-lymphocyte function triggered by anti-CD3 or phosphoantigen." Immunology **127**(3): 398-407.

Malek, T. R. (2008). "The biology of interleukin-2." Annu Rev Immunol **26**: 453-479.

Marakalala, M. J., R. M. Raju, K. Sharma, Y. J. Zhang, E. A. Eugenin, B. Prideaux, I. B. Daudelin, P. Y. Chen, M. G. Booty, J. H. Kim, S. Y. Eum, L. E. Via, S. M. Behar, C. E. Barry, 3rd, M. Mann, V. Dartois and E. J. Rubin (2016). "Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized." Nat Med **22**(5): 531-538.

Martin, P., M. Gomez, A. Lamana, A. Cruz-Adalia, M. Ramirez-Huesca, M. A. Ursa, M. Yanez-Mo and F. Sanchez-Madrid (2010). "CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation." Mol Cell Biol **30**(20): 4877-4889.

Martin, P., M. Gomez, A. Lamana, A. Matesanz Marin, J. R. Cortes, M. Ramirez-Huesca, O. Barreiro, P. Lopez-Romero, C. Gutierrez-Vazquez, H. de la Fuente, A. Cruz-Adalia and F. Sanchez-Madrid (2010). "The leukocyte activation antigen

CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity." J Allergy Clin Immunol **126**(2): 355-365, 365 e351-353.

Matsumoto, M., K. Atarashi, E. Umemoto, Y. Furukawa, A. Shigeta, M. Miyasaka and T. Hirata (2005). "CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells." J Immunol **175**(12): 8042-8050.

Matsumoto, M., A. Shigeta, Y. Furukawa, T. Tanaka, M. Miyasaka and T. Hirata (2007). "CD43 collaborates with P-selectin glycoprotein ligand-1 to mediate E-selectin-dependent T cell migration into inflamed skin." J Immunol **178**(4): 2499-2506.

Mazzarella, G., A. Bianco, F. Perna, D. D'Auria, E. Grella, E. Moscariello and A. Sanduzzi (2003). "T lymphocyte phenotypic profile in lung segments affected by cavitary and non-cavitary tuberculosis." Clin Exp Immunol **132**(2): 283-288.

McAdam, A. J., A. N. Schweitzer and A. H. Sharpe (1998). "The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells." Immunol Rev **165**: 231-247.

Michel, N. A., A. Zirlik and D. Wolf (2017). "CD40L and Its Receptors in Atherothrombosis-An Update." Front Cardiovasc Med **4**: 40.

Mihret, A., Y. Bekele, K. Bobosha, M. Kidd, A. Aseffa, R. Howe and G. Walzl (2013). "Plasma cytokines and chemokines differentiate between active disease and non-active tuberculosis infection." J Infect **66**(4): 357-365.

Miki, Y., T. Itoh, K. Hirano, S. Eda, A. Hayashi, M. Yamanaka and M. Beppu (2009). "Clearance of oxidatively damaged cells by macrophages: recognition of glycoprotein clusters by macrophage-surface nucleolin as early apoptotic cells." Biol Pharm Bull **32**(4): 564-572.

Miki, Y., E. Oguri, K. Hirano and M. Beppu (2013). "Macrophage recognition of cells with elevated calcium is mediated by carbohydrate chains of CD43." Cell Struct Funct **38**(1): 43-54.

Milkova, L., V. Voelcker, I. Forstreuter, U. Sack, U. Anderegg, J. C. Simon and C. Maier-Simon (2010). "The NF-kappaB signalling pathway is involved in the LPS/IL-2-induced upregulation of FoxP3 expression in human CD4+CD25high regulatory T cells." Exp Dermatol **19**(1): 29-37.

Mittrucker, H. W., M. Kursar, A. Kohler, R. Hurwitz and S. H. Kaufmann (2001). "Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*." J Immunol **167**(10): 5620-5627.

Modak, M., O. Majdic, P. Cejka, S. Jutz, A. Puck, J. G. Gerwien, P. Steinberger, G. J. Zlabinger, H. Strobl and J. Stockl (2016). "Engagement of distinct epitopes on CD43 induces different co-stimulatory pathways in human T cells." Immunology **149**(3): 280-296.

Momtaz, P. and M. A. Postow (2014). "Immunologic checkpoints in cancer therapy: focus on the programmed death-1 (PD-1) receptor pathway." Pharmgenomics Pers Med **7**: 357-365.

Moran, A. E., M. Kovacsovics-Bankowski and A. D. Weinberg (2013). "The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy." Curr Opin Immunol **25**(2): 230-237.

- Morosini, M., F. Meloni, M. Uccelli, A. Marone Bianco, N. Solari and A. M. Fietta (2005). "Ex vivo evaluation of PPD-specific IFN-gamma or IL-5 secreting cells in the peripheral blood and lungs of patients with tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **9**(7): 753-759.
- Mudaliar, A. V., R. S. Kashyap, H. J. Purohit, G. M. Taori and H. F. Dagainawala (2006). "Detection of 65 kD heat shock protein in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis patients." BMC Neurol **6**: 34.
- Naffin-Olivos, J. L., M. Georgieva, N. Goldfarb, R. Madan-Lala, L. Dong, E. Bizzell, E. Valinetz, G. S. Brandt, S. Yu, D. E. Shabashvili, D. Ringe, B. M. Dunn, G. A. Petsko and J. Rengarajan (2014). "Mycobacterium tuberculosis Hip1 modulates macrophage responses through proteolysis of GroEL2." PLoS Pathog **10**(5): e1004132.
- Nandi, B. and S. M. Behar (2011). "Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection." J Exp Med **208**(11): 2251-2262.
- Nathan, C., Q. W. Xie, L. Halbwachs-Mecarelli and W. W. Jin (1993). "Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin)." J Cell Biol **122**(1): 243-256.
- Nolan, A., R. Condos, M. L. Huie, R. Dawson, K. Dheda, E. Bateman, W. N. Rom and M. D. Weiden (2013). "Elevated IP-10 and IL-6 from bronchoalveolar lavage cells are biomarkers of non-cavitary tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **17**(7): 922-927.
- Nong, Y. H., E. Remold-O'Donnell, T. W. LeBien and H. G. Remold (1989). "A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes." J Exp Med **170**(1): 259-267.
- Nonomura, C., J. Kikuchi, N. Kiyokawa, H. Ozaki, K. Mitsunaga, H. Ando, A. Kanamori, R. Kannagi, J. Fujimoto, K. Muroi, Y. Furukawa and M. Nakamura (2008). "CD43, but not P-selectin glycoprotein ligand-1, functions as an E-selectin counter-receptor in human pre-B-cell leukemia NALL-1." Cancer Res **68**(3): 790-799.
- O'Garra, A., P. S. Redford, F. W. McNab, C. I. Bloom, R. J. Wilkinson and M. P. Berry (2013). "The immune response in tuberculosis." Annu Rev Immunol **31**: 475-527.
- Ohkawara, Y., K. G. Lim, Z. Xing, M. Glibetic, K. Nakano, J. Dolovich, K. Croitoru, P. F. Weller and M. Jordana (1996). "CD40 expression by human peripheral blood eosinophils." J Clin Invest **97**(7): 1761-1766.
- Okamoto Yoshida, Y., M. Umemura, A. Yahagi, R. L. O'Brien, K. Ikuta, K. Kishihara, H. Hara, S. Nakae, Y. Iwakura and G. Matsuzaki (2010). "Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung." J Immunol **184**(8): 4414-4422.
- Pallant, A., A. Eskenazi, M. G. Mattei, R. E. Fournier, S. R. Carlsson, M. Fukuda and J. G. Frelinger (1989). "Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(4): 1328-1332.

Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nat Immunol **8**(12): 1353-1362.

Pang, H., Q. Yu, B. Guo, Y. Jiang, L. Wan, J. Li, Y. Wu and K. Wan (2013). "Frequency of regulatory T-cells in the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis from shanxi province, china." PLoS One **8**(6): e65496.

Paul, A. G., P. J. van Kooten, W. van Eden and R. van der Zee (2000). "Highly autoproliferative T cells specific for 60-kDa heat shock protein produce IL-4/IL-10 and IFN-gamma and are protective in adjuvant arthritis." J Immunol **165**(12): 7270-7277.

Pedersen, A. E. and J. P. Lauritsen (2009). "CD25 shedding by human natural occurring CD4+CD25+ regulatory T cells does not inhibit the action of IL-2." Scand J Immunol **70**(1): 40-43.

Pedraza-Alva, G., L. B. Merida, R. del Rio, N. A. Fierro, M. E. Cruz-Munoz, N. Olivares, E. Melchy, V. Igras, G. A. Hollander, S. J. Burakoff and Y. Rosenstein (2011). "CD43 regulates the threshold for T cell activation by targeting Cbl functions." IUBMB Life **63**(10): 940-948.

Periasamy, S., R. Dhiman, P. F. Barnes, P. Paidipally, A. Tvinnereim, A. Bandaru, V. L. Valluri and R. Vankayalapati (2011). "Programmed death 1 and cytokine inducible SH2-containing protein dependent expansion of regulatory T cells upon stimulation With Mycobacterium tuberculosis." J Infect Dis **203**(9): 1256-1263.

Peters, W. and J. D. Ernst (2003). "Mechanisms of cell recruitment in the immune response to Mycobacterium tuberculosis." Microbes Infect **5**(2): 151-158.

Pieters, J. (2008). "Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance." Cell Host Microbe **3**(6): 399-407.

Pinheiro, M. B., L. R. Antonelli, R. Sathler-Avelar, D. M. Vitelli-Avelar, S. Spindola-de-Miranda, T. M. Guimaraes, A. Teixeira-Carvalho, O. A. Martins-Filho and V. P. Toledo (2012). "CD4-CD8-alpha-beta and gamma-delta T cells display inflammatory and regulatory potentials during human tuberculosis." PLoS One **7**(12): e50923.

Power, C. A., G. Wei and P. A. Bretscher (1998). "Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route." Infect Immun **66**(12): 5743-5750.

Qamra, R., S. C. Mande, A. R. Coates and B. Henderson (2005). "The unusual chaperonins of Mycobacterium tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **85**(5-6): 385-394.

Qamra, R., V. Srinivas and S. C. Mande (2004). "Mycobacterium tuberculosis GroEL homologues unusually exist as lower oligomers and retain the ability to suppress aggregation of substrate proteins." J Mol Biol **342**(2): 605-617.

Radulovic, K., C. Manta, V. Rossini, K. Holzmann, H. A. Kestler, U. M. Wegenka, T. Nakayama and J. H. Niess (2012). "CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential." J Immunol **188**(4): 2001-2013.

Radulovic, K., V. Rossini, C. Manta, K. Holzmann, H. A. Kestler and J. H. Niess (2013). "The early activation marker CD69 regulates the expression of chemokines and CD4 T cell accumulation in intestine." PLoS One **8**(6): e65413.

Ramirez-Pliego, O., D. L. Escobar-Zarate, G. M. Rivera-Martinez, M. G. Cervantes-Badillo, F. R. Esquivel-Guadarrama, G. Rosas-Salgado, Y. Rosenstein and M. A. Santana (2007). "CD43 signals induce Type One lineage commitment of human CD4+ T cells." BMC Immunol **8**: 30.

Randhawa, A. K., H. J. Ziltener, J. S. Merzaban and R. W. Stokes (2005). "CD43 is required for optimal growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and in mice." J Immunol **175**(3): 1805-1812.

Randhawa, A. K., H. J. Ziltener and R. W. Stokes (2008). "CD43 controls the intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis through the induction of TNF-alpha-mediated apoptosis." Cell Microbiol **10**(10): 2105-2117.

Reddy, M., E. Eirikis, C. Davis, H. M. Davis and U. Prabhakar (2004). "Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function." J Immunol Methods **293**(1-2): 127-142.

Redford, P. S., A. Boonstra, S. Read, J. Pitt, C. Graham, E. Stavropoulos, G. J. Bancroft and A. O'Garra (2010). "Enhanced protection to Mycobacterium tuberculosis infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung." Eur J Immunol **40**(8): 2200-2210.

Remold-O'Donnell, E., C. Zimmerman, D. Kenney and F. S. Rosen (1987). "Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome." Blood **70**(1): 104-109.

Rengarajan, J., E. Murphy, A. Park, C. L. Krone, E. C. Hett, B. R. Bloom, L. H. Glimcher and E. J. Rubin (2008). "Mycobacterium tuberculosis Rv2224c modulates innate immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(1): 264-269.

Resende Co, T., C. S. Hirsch, Z. Toossi, R. Dietze and R. Ribeiro-Rodrigues (2007). "Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-Mycobacterium tuberculosis immunity and clinical response to tuberculosis therapy." Clin Exp Immunol **147**(1): 45-52.

Riha, P. and C. E. Rudd (2010). "CD28 co-signaling in the adaptive immune response." Self Nonself **1**(3): 231-240.

Rogers, P. R., J. Song, I. Gramaglia, N. Killeen and M. Croft (2001). "OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells." Immunity **15**(3): 445-455.

Rojas, R. E., K. N. Balaji, A. Subramanian and W. H. Boom (1999). "Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis by interleukin-10 and transforming growth factor beta." Infect Immun **67**(12): 6461-6472.

Rosenkranz, A. R., O. Majdic, J. Stockl, W. Pickl, H. Stockinger and W. Knapp (1993). "Induction of neutrophil homotypic adhesion via sialophorin (CD43), a surface sialoglycoprotein restricted to haemopoietic cells." Immunology **80**(3): 431-438.

Rosenstein, Y., J. K. Park, W. C. Hahn, F. S. Rosen, B. E. Bierer and S. J. Burakoff (1991). "CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1." Nature **354**(6350): 233-235.

Rothchild, A. C., B. Stowell, G. Goyal, C. Nunes-Alves, Q. Yang, K. Papavinasasundaram, C. M. Sasseti, G. Dranoff, X. Chen, J. Lee and S. M. Behar (2017). "Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Production by T Cells during Mycobacterium tuberculosis Infection." MBio **8**(5).

Ruhl, S., J. O. Cisar and A. L. Sandberg (2000). "Identification of polymorphonuclear leukocyte and HL-60 cell receptors for adhesins of Streptococcus gordonii and Actinomyces naeslundii." Infect Immun **68**(11): 6346-6354.

Salek-Ardakani, S., M. Moutaftsi, S. Crotty, A. Sette and M. Croft (2008). "OX40 drives protective vaccinia virus-specific CD8 T cells." J Immunol **181**(11): 7969-7976.

Salmaninejad, A., S. F. Valilou, A. G. Shabgah, S. Aslani, M. Alimardani, A. Pasdar and A. Sahebkar (2019). "PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy." J Cell Physiol **234**(10): 16824-16837.

Samten, B., E. K. Thomas, J. Gong and P. F. Barnes (2000). "Depressed CD40 ligand expression contributes to reduced gamma interferon production in human tuberculosis." Infect Immun **68**(5): 3002-3006.

Samten, B., B. Wizel, H. Shams, S. E. Weis, P. Klucar, S. Wu, R. Vankayalapati, E. K. Thomas, S. Okada, A. M. Krensky and P. F. Barnes (2003). "CD40 ligand trimer enhances the response of CD8+ T cells to Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **170**(6): 3180-3186.

Sancho, D., M. Gomez, F. Viedma, E. Esplugues, M. Gordon-Alonso, M. A. Garcia-Lopez, H. de la Fuente, A. C. Martinez, P. Lauzurica and F. Sanchez-Madrid (2003). "CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis." J Clin Invest **112**(6): 872-882.

Santana, M. A., G. Pedraza-Alva, N. Olivares-Zavaleta, V. Madrid-Marina, V. Horejsi, S. J. Burakoff and Y. Rosenstein (2000). "CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes." J Biol Chem **275**(40): 31460-31468.

Saunders, B. M., A. A. Frank, I. M. Orme and A. M. Cooper (2000). "Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection." Infect Immun **68**(6): 3322-3326.

Schonbeck, U. and P. Libby (2001). "The CD40/CD154 receptor/ligand dyad." Cell Mol Life Sci **58**(1): 4-43.

Semple, P. L., A. B. Binder, M. Davids, A. Maredza, R. N. van Zyl-Smit and K. Dheda (2013). "Regulatory T cells attenuate mycobacterial stasis in alveolar and blood-derived macrophages from patients with tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **187**(11): 1249-1258.

Sethna, K. B., N. F. Mistry, Y. Dholakia, N. H. Antia and M. Harboe (1998). "Longitudinal trends in serum levels of mycobacterial secretory (30 kD) and

cytoplasmic (65 kD) antigens during chemotherapy of pulmonary tuberculosis patients." Scand J Infect Dis **30**(4): 363-369.

Sharma, A., T. Rustad, G. Mahajan, A. Kumar, K. V. Rao, S. Banerjee, D. R. Sherman and S. C. Mande (2016). "Towards understanding the biological function of the unusual chaperonin Cpn60.1 (GroEL1) of *Mycobacterium tuberculosis*." Tuberculosis (Edinb) **97**: 137-146.

Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." Nat Rev Immunol **2**(2): 116-126.

Shen, H. and Z. W. Chen (2018). "The crucial roles of Th17-related cytokines/signal pathways in *M. tuberculosis* infection." Cell Mol Immunol **15**(3): 216-225.

Shen, L., H. Shi, Y. Gao, Q. Ou, Q. Liu, Y. Liu, J. Wu, W. Zhang, L. Fan and L. Shao (2016). "The characteristic profiles of PD-1 and PD-L1 expressions and dynamic changes during treatment in active tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **101**: 146-150.

Sheppard, K. A., L. J. Fitz, J. M. Lee, C. Benander, J. A. George, J. Wooters, Y. Qiu, J. M. Jussif, L. L. Carter, C. R. Wood and D. Chaudhary (2004). "PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ ." FEBS Lett **574**(1-3): 37-41.

Shinnick, T. M., D. Sweetser, J. Thole, J. van Embden and R. A. Young (1987). "The etiologic agents of leprosy and tuberculosis share an immunoreactive protein antigen with the vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG." Infect Immun **55**(8): 1932-1935.

Shiow, L. R., D. B. Rosen, N. Brdickova, Y. Xu, J. An, L. L. Lanier, J. G. Cyster and M. Matloubian (2006). "CD69 acts downstream of interferon- $\alpha/\beta$  to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs." Nature **440**(7083): 540-544.

Sia, J. K., E. Bizzell, R. Madan-Lala and J. Rengarajan (2017). "Engaging the CD40-CD40L pathway augments T-helper cell responses and improves control of *Mycobacterium tuberculosis* infection." PLoS Pathog **13**(8): e1006530.

Sieber, M. and R. Baumgrass (2009). "Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506?" Cell Commun Signal **7**: 25.

Silva, B. D. S., M. M. Trentini, A. C. da Costa, A. Kipnis and A. P. Junqueira-Kipnis (2014). "Different phenotypes of CD8+ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis." Immunol Lett **160**(1): 23-32.

Simms, P. E. and T. M. Ellis (1996). "Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation." Clin Diagn Lab Immunol **3**(3): 301-304.

Skoberne, M., T. Malovrh, A. Skralovnik-Stern and V. Kotnik (2000). "Human peripheral blood lymphocytes sensitised to PPD respond to in vitro stimulation with increased expression of CD69 and CD134 activation antigens and production of Th-1 type cytokines." Pflugers Arch **440**(5 Suppl): R58-60.

Snelgrove, R. J., M. M. Cornere, L. Edwards, B. Dagg, J. Keeble, A. Rodgers, D. E. Lyonga, G. R. Stewart, D. B. Young, B. Walker and T. Hussell (2012). "OX40 ligand fusion protein delivered simultaneously with the BCG vaccine provides

superior protection against murine *Mycobacterium tuberculosis* infection." J Infect Dis **205**(6): 975-983.

Socio, G. V., R. Gerli and F. Menichetti (1999). "Disseminated tuberculosis and idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia." Clin Microbiol Infect **5**(10): 653-654.

Soroosh, P., S. Ine, K. Sugamura and N. Ishii (2007). "Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4+ T cells." J Immunol **179**(8): 5014-5023.

Staron, M. M., S. M. Gray, H. D. Marshall, I. A. Parish, J. H. Chen, C. J. Perry, G. Cui, M. O. Li and S. M. Kaech (2014). "The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection." Immunity **41**(5): 802-814.

Stockl, J., O. Majdic, P. Kohl, W. F. Pickl, J. E. Menzel and W. Knapp (1996). "Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation." J Exp Med **184**(5): 1769-1779.

Stuber, E., M. Neurath, D. Calderhead, H. P. Fell and W. Strober (1995). "Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells." Immunity **2**(5): 507-521.

Stuber, E. and W. Strober (1996). "The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response." J Exp Med **183**(3): 979-989.

Suarez, G. V., C. D. C. Melucci Ganzarain, M. B. Vecchione, C. A. Trifone, J. L. Marin Franco, M. Genoula, E. J. Morana, L. Balboa and M. F. Quiroga (2019). "PD-1/PD-L1 Pathway Modulates Macrophage Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* Specific CD8(+) T cell Induced Death." Sci Rep **9**(1): 187.

Sun, Q., W. Wei and W. Sha (2016). "Potential Role for *Mycobacterium tuberculosis* Specific IL-2 and IFN-gamma Responses in Discriminating between Latent Infection and Active Disease after Long-Term Stimulation." PLoS One **11**(12): e0166501.

Suttles, J. and R. D. Stout (2009). "Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis." Semin Immunol **21**(5): 257-264.

Suzukawa, M., S. Akashi, H. Nagai, H. Nagase, H. Nakamura, H. Matsui, A. Hebisawa and K. Ohta (2016). "Combined Analysis of IFN-gamma, IL-2, IL-5, IL-10, IL-1RA and MCP-1 in QFT Supernatant Is Useful for Distinguishing Active Tuberculosis from Latent Infection." PLoS One **11**(4): e0152483.

Tan, Q., R. Min, G. Q. Dai, Y. L. Wang, L. Nan, Z. Yang, J. Xia, S. Y. Pan, H. Mao, W. P. Xie and H. Wang (2017). "Clinical and Immunological Effects of rhIL-2 Therapy in Eastern Chinese Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis." Sci Rep **7**(1): 17854.

Tanaka, Y., C. T. Morita, E. Nieves, M. B. Brenner and B. R. Bloom (1995). "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells." Nature **375**(6527): 155-158.

Tebuegge, M., B. Dutta, S. Donath, N. Ritz, B. Forbes, K. Camacho-Badilla, V. Clifford, C. Zufferey, R. Robins-Browne, W. Hanekom, S. M. Graham, T. Connell and N. Curtis (2015). "Mycobacteria-Specific Cytokine Responses Detect

Tuberculosis Infection and Distinguish Latent from Active Tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **192**(4): 485-499.

Teitelbaum, R., M. Cammer, M. L. Maitland, N. E. Freitag, J. Condeelis and B. R. Bloom (1999). "Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15190-15195.

Terrazzano, G., S. Pisanti, S. Grimaldi, M. Sica, S. Fontana, E. Carbone, S. Zappacosta and G. Ruggiero (2004). "Interaction between natural killer and dendritic cells: the role of CD40, CD80 and major histocompatibility complex class I molecules in cytotoxicity induction and interferon-gamma production." Scand J Immunol **59**(4): 356-362.

Torres-Huerta, A., T. Villasenor, A. Flores-Alcantar, C. Parada, E. Aleman-Navarro, C. Espitia, G. Pedraza-Alva and Y. Rosenstein (2017). "Interaction of the CD43 Sialomucin with the Mycobacterium tuberculosis Cpn60.2 Chaperonin Leads to Tumor Necrosis Factor Alpha Production." Infect Immun **85**(3).

Toscano, M. A., G. A. Bianco, J. M. Ilarregui, D. O. Croci, J. Correale, J. D. Hernandez, N. W. Zwirner, F. Poirier, E. M. Riley, L. G. Baum and G. A. Rabinovich (2007). "Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death." Nat Immunol **8**(8): 825-834.

Treerat, P., O. Prince, A. Cruz-Lagunas, M. Munoz-Torrico, M. A. Salazar-Lezama, M. Selman, B. Fallert-Junecko, T. A. Reinhardt, J. F. Alcorn, D. Kaushal, J. Zuniga, J. Rangel-Moreno, J. K. Kolls and S. A. Khader (2017). "Novel role for IL-22 in protection during chronic Mycobacterium tuberculosis HN878 infection." Mucosal Immunol **10**(4): 1069-1081.

Ubolyam, S., T. Iampornsini, J. Sophonphan, A. Avihingsanon, G. Suwanpimolkul, K. Kawkitinarong, W. Manosuthi, S. Gatechompol, J. Ananworanich, K. Ruxrungtham, P. Phanuphak and A. D. Kelleher (2021). "Performance of a simple flow cytometric assay in diagnosing active tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **126**: 102017.

Umemura, M., A. Yahagi, S. Hamada, M. D. Begum, H. Watanabe, K. Kawakami, T. Suda, K. Sudo, S. Nakae, Y. Iwakura and G. Matsuzaki (2007). "IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection." J Immunol **178**(6): 3786-3796.

van den Berg, T. K., D. Nath, H. J. Ziltener, D. Vestweber, M. Fukuda, I. van Die and P. R. Crocker (2001). "Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1)." J Immunol **166**(6): 3637-3640.

van den Broek, M. F., E. J. Hogervorst, M. C. Van Bruggen, W. Van Eden, R. van der Zee and W. B. van den Berg (1989). "Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein." J Exp Med **170**(2): 449-466.

van Eden, W., J. E. Thole, R. van der Zee, A. Noordzij, J. D. van Embden, E. J. Hensen and I. R. Cohen (1988). "Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis." Nature **331**(6152): 171-173.

van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." J Leukoc Biol **67**(1): 2-17.

Van Snick, J. (1990). "Interleukin-6: an overview." Annu Rev Immunol **8**: 253-278.

Vanichakarn, P., P. Blair, C. Wu, J. E. Freedman and S. Chakrabarti (2008). "Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation." Thromb Res **122**(3): 346-358.

Varga, G., N. Nippe, S. Balkow, T. Peters, M. K. Wild, S. Seeliger, S. Beissert, M. Krummen, J. Roth, C. Sunderkotter and S. Grabbe (2010). "LFA-1 contributes to signal I of T-cell activation and to the production of T(h)1 cytokines." J Invest Dermatol **130**(4): 1005-1012.

Vargas-Romero, F., N. Guitierrez-Najera, G. Mendoza-Hernandez, D. Ortega-Bernal, R. Hernandez-Pando and M. Castanon-Arreola (2016). "Secretome profile analysis of hypervirulent Mycobacterium tuberculosis CPT31 reveals increased production of EsxB and proteins involved in adaptation to intracellular lifestyle." Pathog Dis **74**(2).

Vega-Ramos, J., E. Alari-Pahissa, J. D. Valle, E. Carrasco-Marin, E. Esplugues, M. Borrás, A. C. Martínez and P. Lauzurica (2010). "CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to Listeria monocytogenes infection." Immunol Cell Biol **88**(7): 707-715.

Velazquez, F., A. Grodecki-Pena, A. Knapp, A. M. Salvador, T. Nevers, K. Croce and P. Alcaide (2016). "CD43 Functions as an E-Selectin Ligand for Th17 Cells In Vitro and Is Required for Rolling on the Vascular Endothelium and Th17 Cell Recruitment during Inflammation In Vivo." J Immunol **196**(3): 1305-1316.

Venkatasubramanian, S., R. Dhiman, P. Paidipally, S. S. Cheekatla, D. Tripathi, E. Welch, A. R. Tvinnereim, B. Jones, D. Theodorescu, P. F. Barnes and R. Vankayalapati (2015). "A rho GDP dissociation inhibitor produced by apoptotic T-cells inhibits growth of Mycobacterium tuberculosis." PLoS Pathog **11**(2): e1004617.

Via, C. S., V. Rus, P. Nguyen, P. Linsley and W. C. Gause (1996). "Differential effect of CTLA4Ig on murine graft-versus-host disease (GVHD) development: CTLA4Ig prevents both acute and chronic GVHD development but reverses only chronic GVHD." J Immunol **157**(9): 4258-4267.

Vorkas, C. K., M. F. Wiperman, K. Li, J. Bean, S. K. Bhattarai, M. Adamow, P. Wong, J. Aube, M. A. J. Juste, V. Bucci, D. W. Fitzgerald and M. S. Glickman (2018). "Mucosal-associated invariant and gammadelta T cell subsets respond to initial Mycobacterium tuberculosis infection." JCI Insight **3**(19).

Walling, B. L. and M. Kim (2018). "LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation." Front Immunol **9**: 952.

Wang, Y., D. Li, R. Nurieva, J. Yang, M. Sen, R. Carreno, S. Lu, B. W. McIntyre, J. J. Molldrem, G. B. Legge and Q. Ma (2009). "LFA-1 affinity regulation is necessary for the activation and proliferation of naive T cells." J Biol Chem **284**(19): 12645-12653.

Webb, G. J., G. M. Hirschfield and P. J. Lane (2016). "OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review." Clin Rev Allergy Immunol **50**(3): 312-332.

Wijewarnasuriya, D., C. Bebernitz, A. V. Lopez, S. Rafiq and R. J. Brentjens (2020). "Excessive Costimulation Leads to Dysfunction of Adoptively Transferred T Cells." Cancer Immunol Res **8**(6): 732-742.

Willoughby, J., J. Griffiths, I. Tews and M. S. Cragg (2017). "OX40: Structure and function - What questions remain?" Mol Immunol **83**: 13-22.

Wolf, A. J., L. Desvignes, B. Linas, N. Banaiee, T. Tamura, K. Takatsu and J. D. Ernst (2008). "Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs." J Exp Med **205**(1): 105-115.

Wolf, D., J. D. Hohmann, A. Wiedemann, K. Bledzka, H. Blankenbach, T. Marchini, K. Gutte, K. Zeschky, N. Bassler, N. Hoppe, A. O. Rodriguez, N. Herr, I. Hilgendorf, P. Stachon, F. Willecke, D. Duerschmied, C. von zur Muhlen, D. A. Soloviev, L. Zhang, C. Bode, E. F. Plow, P. Libby, K. Peter and A. Zirlik (2011). "Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKKSRTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis--but does not affect immunity and thrombosis in mice." Circ Res **109**(11): 1269-1279.

Wong, E. A., L. Joslyn, N. L. Grant, E. Klein, P. L. Lin, D. E. Kirschner and J. L. Flynn (2018). "Low Levels of T Cell Exhaustion in Tuberculous Lung Granulomas." Infect Immun **86**(9).

Woodworth, J. S., Y. Wu and S. M. Behar (2008). "Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells require perforin to kill target cells and provide protection in vivo." J Immunol **181**(12): 8595-8603.

Wu, B., C. Huang, M. Kato-Maeda, P. C. Hopewell, C. L. Daley, A. M. Krensky and C. Clayberger (2008). "IL-9 is associated with an impaired Th1 immune response in patients with tuberculosis." Clin Immunol **126**(2): 202-210.

Wu, C., Z. Li, X. Fu, S. Yu, S. Lao and B. Yang (2015). "Antigen-specific human NKT cells from tuberculosis patients produce IL-21 to help B cells for the production of immunoglobulins." Oncotarget **6**(30): 28633-28645.

Wu, Y. E., Z. R. Du, Y. M. Cai, W. G. Peng, G. Z. Zheng, G. L. Zheng, L. B. Wu and K. Li (2015). "Effective expansion of forkhead box P3(+) regulatory T cells via early secreted antigenic target 6 and antigen 85 complex B from Mycobacterium tuberculosis." Mol Med Rep **11**(4): 3134-3142.

Wuest, S. C., J. H. Edwan, J. F. Martin, S. Han, J. S. Perry, C. M. Cartagena, E. Matsuura, D. Maric, T. A. Waldmann and B. Bielekova (2011). "A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy." Nat Med **17**(5): 604-609.

Yao, X., Y. Liu, W. Liu, Z. Ye, C. Zheng and S. Ge (2017). "Multiplex analysis of plasma cytokines/chemokines showing different immune responses in active TB patients, latent TB infection and healthy participants." Tuberculosis (Edinb) **107**: 88-94.

Yu, L., F. Yang, F. Zhang, D. Guo, L. Li, X. Wang, T. Liang, J. Wang, Z. Cai and H. Jin (2018). "CD69 enhances immunosuppressive function of regulatory T-cells and attenuates colitis by prompting IL-10 production." Cell Death Dis **9**(9): 905.

Yu, Y., Y. Zhang, S. Hu, D. Jin, X. Chen, Q. Jin and H. Liu (2012). "Different patterns of cytokines and chemokines combined with IFN-gamma production reflect Mycobacterium tuberculosis infection and disease." PLoS One **7**(9): e44944.

Zanin-Zhorov, A., G. Tal-Lapidot, L. Cahalon, M. Cohen-Sfady, M. Pevsner-Fischer, O. Lider and I. R. Cohen (2007). "Cutting edge: T cells respond to lipopolysaccharide innately via TLR4 signaling." J Immunol **179**(1): 41-44.

Zanin-Zhorov, A., G. Tal, S. Shvitiel, M. Cohen, T. Lapidot, G. Nussbaum, R. Margalit, I. R. Cohen and O. Lider (2005). "Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation." J Immunol **175**(1): 276-285.

Zemelman, B. V., S. H. Chu and W. A. Walker (1989). "Host response to Escherichia coli heat-labile enterotoxin via two microvillus membrane receptors in the rat intestine." Infect Immun **57**(10): 2947-2952.

Zhang, B., S. Chikuma, S. Hori, S. Fagarasan and T. Honjo (2016). "Nonoverlapping roles of PD-1 and FoxP3 in maintaining immune tolerance in a novel autoimmune pancreatitis mouse model." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(30): 8490-8495.

Zhang, Y., J. Liu, Y. Wang, Q. Xian, L. Shao, Z. Yang and X. Wang (2012). "Immunotherapy using IL-2 and GM-CSF is a potential treatment for multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis." Sci China Life Sci **55**(9): 800-806.

Zirlik, A., C. Maier, N. Gerdes, L. MacFarlane, J. Soosairajah, U. Bavendiek, I. Ahrens, S. Ernst, N. Bassler, A. Missiou, Z. Patko, M. Aikawa, U. Schonbeck, C. Bode, P. Libby and K. Peter (2007). "CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1." Circulation **115**(12): 1571-1580.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART  
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS  
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “**Papel de CD43 en el reconocimiento de Cpn60.2 de *Mycobacterium tuberculosis* por linfocitos T**” que presenta el alumno **Den Alejandro Alvarado Velázquez (10012808)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz FM-UAEM	APROBADO	
Dr. Rogelio Hernández Pando Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán	APROBADO	
Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay IBT-UNAM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY | Fecha:2021-10-14 20:58:58 | Firmante**

x8w8LgY34yQWbe8AWqDXMctluhcMe6hfOehHRFN2ABqMP/oeMFWym22BSn CZ+xBtPOBundwlcGhRBd5GvQMctcG+u5k1dteaCnHehW+0mZFiT3QYVXjdMaBf4llwm3iuJw/xb6eVvRp3QcFVnCVqkd3j2q8JBQlnXKUUIUAvshRi2HQv//Bij0go22Btx1TGhU0OA+WLIHh1X1zoxueXpgiBeB60CST4E/jftbcVhbhS3lZn0nSeuATAVki9i3/DxqvQkVjmdzBTa4ll4DvjD4gabpFchRtGC1BT4OCNebVowSZBwUoWatrCY8XPDRlZohDFdWe8UgQD5pvghLw==

**MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2021-10-14 21:12:41 | Firmante**

DUGSTQabDA7CMie1fqEJ+3na3azGhE+IHTSMJd9Hn6Y4AMXNq8wZfyFCe53hTH1K4NxCvAHqBVb7a7KjFpkdcqF003hBIMlxaxbrDkWr1Vu8SCcH2rhjSobk6r2yAr4nEamyoGs+IVnVS4gy+IU6Q/WNsET2FBnymWK5ZMyIHL2724uiU2U/Gd9WMEE1wXDC1gQwosNijOq7Zbdle50XXBWMGz2xYy3RhtQWg3VbxZBGX3a8xQ278E871FvIXcQwsOHoWZJfiyvaslfpNuRnM1M9sizmWpITSmUoYKl1TTw/xNt/nvgZgNVa833lvNFD7SzHPHOwOXEijHVxUZDXgQ==

**IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2021-10-14 21:59:00 | Firmante**

M17C++qOCvWVIG93T3Yt8Bh6WMhPrsjdoA/jQfi/pt7Tml80/pvna0GGZs8x+exF31JQ+2uAeHDFGL9YtzyOdgsTFAvfrB/bSSulNGAfySz88nrcsfYDHvYFE219QsAzA4nE2saQJ/I8C3y+QuCk2qxHogVDZSZNee2ql+P+FOpnlIqaxK7Xtsn4R+aNZMkz7CM49fFwDYhTGktI0RUDQ26O1RZSLBj35tyZ1bl7OKIRuWZ4u4R//h12/dO2qliMcLZ29ND0/YART+Af3jSMnkGsmITPEjPE/ROUIMC2PoN9oSeq1NmwEd6f342ccSz1eDhpo1jtKc1imD8wt4Q==

**MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2021-10-14 22:44:24 | Firmante**

AlzdfsJAQoPEOaLvmPYGgAt1cYgGCXT+784FPg9Wm9VPvpBQBWeaOPQt.1+yIIWsUjgJu5J5TYMBPFvzlarXVJAwKU6VJOzfGTgST8u3i6czfApKBnZ1QF7dQNJilqHVnDhF+6JpxZyzkLP8kqEEntPgJQPWDHf9G8UqN2kDtvKGPswJIGhjGRjxrB77jA3HuRNDva9rVogdW0DHzwPeXKVXfc/7mVz4AqY30y3/375PqJPBYUn3O9d0JPIPWQOJbiVTGdw70Za4uN61h5CGWMSOAcXNYBUDKf2Cb1soKilRm/2h7esH10d8yGJ9a8X4ujDk1Bfsyk+H6x9I/IBfeQ==

**ROGELIO ENRIQUE HERNANDEZ PANDO | Fecha:2021-10-15 09:19:37 | Firmante**

tyRwMWJcStQInzAsoaEngWG3jntL6//czc+j4HQDODWlyovLlnJWoetbRaw5d+ckLSKgVQ9P7FcNb0EqrXHLAcGv4Ww++GzCbXl3WrvJw0N24gQ+5M0DSNpLB3hrEf06ccGqjz6GNpa1LQiDq8yKxc3nLnllg3VpFNW6boFrXQM2bc0KK+cC8Pg7dr1r7UvypkVyyqfV+21ucSBvPRVJJ32RrLFSarVJax4m/FjNY+qn5skDC8A7ac9ZA50t5Im+XQ1IPH9fNRV8jCioMYIgyKebllsn47Z8jsK43oRgnkCd/GNVGg8wrJe/sun9e+tlI2Y4YQKLg0neKoiXrhaZm5A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**QaxW2ro5k**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9jNP99q2xhWxmEpa83BjJHLpLmUn81k>

