



Álvarez, Guadalupe Inés

# Regulación genética y epigenética de la producción de IFN- $\gamma$ y su asociación a la susceptibilidad a la tuberculosis



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Álvarez, G. I. (2022). *Regulación genética y epigenética de la producción de IFN- $\gamma$  y su asociación a la susceptibilidad a la Tuberculosis. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3907>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## **Regulación genética y epigenética de la producción de IFN- $\gamma$ y su asociación con la susceptibilidad a la Tuberculosis**

**TESIS DOCTORAL**

**Guadalupe Inés Álvarez**

guadaines.alvarez@gmail.com

### **Resumen**

La tuberculosis, causada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, a pesar de ser una enfermedad curable, continúa siendo un grave problema para la salud mundial causando altos niveles de morbilidad y mortalidad. Comprender el rol de los factores genéticos en el control de la resistencia/susceptibilidad a la tuberculosis abriría posibilidades de desarrollar medidas preventivas y terapias genotípicas-específicas, optimizando la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*. Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) son la “marca genética de susceptibilidad” elegida en estudios de caso-control. Teniendo en cuenta la importancia del IFN- $\gamma$  en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*, en el presente trabajo de tesis evaluamos el SNP +874 A/T del IFNG. Previamente reportamos que la Molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM), induce la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, regulando la respuesta Th1 protectora. Teniendo en cuenta estos antecedentes analizamos los SNPs -262 A/T, -188 A/G y +1343 G/T de SLAM. Por otro lado, dado que la proteína de unión a SLAM (SAP) es un regulador negativo de la producción de IFN- $\gamma$  inducida por SLAM, se evaluaron tres SNPs presentes en este gen (-631 A/G, -494 A/G y -346 C/T). De los siete SNPs estudiados, el SNP +874 A/T es el único previamente reportado en estudios de susceptibilidad a la tuberculosis en varias poblaciones alrededor del mundo.

Nuestros resultados demostraron elevada frecuencia del genotipo AA del SNP de IFN- $\gamma$  +874 A/T en el grupo de pacientes con tuberculosis activa, sin embargo no se observó asociación con los niveles de producción de esta citoquina. Así el alelo A y el genotipo AA del SNP +874A/T del IFN- $\gamma$  podría ser considerado un marcador de susceptibilidad a la

tuberculosis en nuestra población de estudio. Sin embargo este marcador no estaría asociado con la severidad de la enfermedad.

En cuanto a los tres SNPs de SLAM analizados, hallamos elevada frecuencia del haplotipo AA/GG de los SNPs de SLAM -262 A/T y -188 A/G y del genotipo GG del SNP de SLAM +1343 G/T en los tres grupos en estudio (pacientes con tuberculosis activa, individuos con tuberculosis latentes y dadores sanos). Debido a esto, los SNPs de SLAM evaluados no pueden ser considerados una marca genética de riesgo para el desarrollo de tuberculosis activa.

Finalmente, al estudiar los SNPs de SAP observamos que los genotipos AA (SNP -631 A/G), GG (SNP -494 A/G) y TT (SNP -346 C/T) de manera individual y de acuerdo a lo esperado, como haplotipo AA/GG/TT, podrían ser marcadores de susceptibilidad para el desarrollo de la tuberculosis, dada su alta frecuencia en el grupo de pacientes con tuberculosis activa. Más aún, estos SNPs se asocian con a una menor producción de IFN- $\gamma$ . En pacientes con tuberculosis activa el alelo T del SNP de SAP -346 C/T se asocia con mayores niveles de ARNm de SAP y menor producción de IFN- $\gamma$ , lo cual podría deberse a que la citosina presente en esta posición es un sitio de metilación (por lo que la presencia del alelo T impide la misma). Interesantemente, hallamos que la combinación haplotípica IFN- $\gamma$ -SAP AA-AA/GG/TT además podría ser considerado un marcador genético de riesgo a la progresión a la tuberculosis activa.

Por otro lado, ha sido sugerido que la variación pre-existente en el epigenoma de poblaciones celulares específicas puede afectar la susceptibilidad del hospedador a la tuberculosis. La metilación del ADN y la acetilación de histonas son los mecanismos de regulación epigenética más ampliamente estudiados. En el presente trabajo decidimos evaluar el estado de metilación del sitio CpG -53 presente en la región promotora del gen de IFN- $\gamma$ . Este sitio ha sido demostrado por tener un fuerte impacto en el control de la expresión de IFNG cuando fue analizado en líneas celulares Th1. Observamos elevada metilación del sitio CpG -53 en muestras de sangre de pacientes con tuberculosis activa, lo que sugiere una falla en la regulación epigenética de este sitio el cual debería demetilarse durante la enfermedad activa, permitiendo la diferenciación eficiente hacia un perfil Th1.

Blimp1 y TLE4 forman un complejo represor capaz de inhibir la expresión del gen de IFN- $\gamma$  en células Th2 y en condiciones de anergia. Interesantemente, observamos que tanto en pacientes con tuberculosis activa como en dadores sanos, la cinética de expresión de los represores se asocia de manera inversa con respecto al IFN- $\gamma$ . Es decir, los mayores niveles de expresión de IFN- $\gamma$  se observaron en aquellos tiempos donde se detectaron los niveles más bajos de ambos represores Blimp1 y TLE4. Así, estos resultados sugerirían un rol represor de Blimp1 y TLE4 en el control de la expresión de IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con *M. tuberculosis*.

El mecanismo de represión del complejo Blimp1/TLE4 es el reclutamiento de deacetilasas de histonas (HDACs) del tipo I/II, metiltransferasas de ADN e histonas metiltransferasas al locus IFNG. Al utilizar el inhibidor de deacetilasas benzamida (MS-275) específico de HDACs del tipo I, la producción de IFN- $\gamma$  se incrementó significativamente. Así, estos resultados demuestran que la deacetilación de las histonas es uno de los mecanismos de regulación negativa de la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis*, sugiriendo además que el complejo Blimp1/TLE4 podría estar involucrado en el control epigenético del IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, a través del reclutamiento de HDACs a la cromatina.

En conjunto los resultados obtenidos permiten establecer una marca genética de susceptibilidad a la tuberculosis y aportan nuevos mecanismos de regulación genética y epigenética de la producción de IFN- $\gamma$  en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*.

**Palabras clave:** Tuberculosis, SNPs, IFN- $\gamma$ , SLAM, SAP, epigenética.

## **Abstract**

Tuberculosis, an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, despite being a curable disease, is still a global health problem that causes high mortality and morbidity rates. Understanding the genetic factors that determine resistance/susceptibility to tuberculosis would open new opportunities for the development of preventive measures and specific genotypic therapies, improving the immune response against *M. tuberculosis*. Single Nucleotides Polymorphisms (SNP) are the susceptibility genetic mark of choice in case control studies. IFN- $\gamma$  is a key cytokine in the immune response against *M. tuberculosis*. Therefore, in this work we evaluated the +874 A/T SNP of IFNG. Moreover, we have previously shown that the Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) induce IFN- $\gamma$  production in response to *M. tuberculosis*, regulating the generation of Th1 protective responses. Taking this in consideration, we analyzed the -262 A/T, -188 A/G and +1343 G/T SLAM SNPs. Moreover, since SLAM associated protein (SAP) is a negative regulator of SLAM induced- IFN- $\gamma$ , three SNPs on this gene were also evaluated (-631 A/G, -494 A/G y -346 C/T). The +874 A/T SNP of IFN- $\gamma$  is the only one of the seven SNPs studied, that has been previously evaluated for tuberculosis susceptibility in other populations around the world. Our results demonstrate an elevated frequency of the AA genotype of the IFN- $\gamma$  +874 A/T SNP in the group of patients with active tuberculosis, however no association was observed with the levels of cytokine produced in response to *M. tuberculosis*. Thus, the Abstract -6- AA genotype of IFN- $\gamma$  +874A/T SNP could be a susceptibility marker of tuberculosis in Argentina. However, this marker was not associated with disease severity. Regarding SLAM SNPs, we found an elevated frequency of the AA/GG haplotype for the

SLAM -262 A/T and -188 A/G SNP; and the GG genotype of SLAM +1343 G/T SNP in the three groups of individual evaluated (patients with active tuberculosis, individuals with latent tuberculosis infection and healthy donors). Therefore, the SLAM SNPs studied could not be considered as genetic markers for tuberculosis susceptibility. Finally, for the SAP SNPs we observed that the AA (SNP -631 A/G), GG (SNP -494 A/G) and TT (SNP -346 C/T) genotypes individually and as an haplotype (AA/GG/TT), could be a strong marker of tuberculosis susceptibility, since the high frequency found in patients with active tuberculosis. Moreover, those SNPs were associated with lower IFN- $\gamma$  production. Patients with the T allele for the SAP -346 C/T SNP showed the highest levels of SAP mRNA and the lowest production of IFN- $\gamma$ , which could be a consequence of a differential epigenetic regulation of the gene (since the cytosine in this position is plausible of being methylated). Interestingly, we found that the SAP haplotype in combination with the AA susceptible genotype of IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ -SAP AA AA/GG/TT) could also be a genetic marker of risk for disease progression. On the other hand, it has been suggested that pre-existing variations in the epigenome of specific cell populations could mediate host susceptibility to tuberculosis. DNA methylation and acetylation of histones are the epigenetic mechanisms more widely studied. In this work we evaluated methylation at the -53 CpG site of the promoter region of IFN- $\gamma$ . This site has a strong impact in the control of IFNG expression in Th1 cell lines. We observed and increased methylation of the -53 CpG site in blood samples of tuberculosis patients, which suggest a failure on the epigenetic regulation during Abstract -7- active disease, since demethylation of this site would occur to allow and efficient Th1 differentiation. Blimp1 and TLE4 binds to form a repressor complex that is capable of inhibits IFN- $\gamma$  gene expression in Th2 cells and during anergic conditions. Interestingly, we observed that M. tuberculosis stimulated cells from patients with active tuberculosis and healthy donors positively regulated these two repressors and that it's kinetic of expression was negatively associated with IFN- $\gamma$  mRNA expression. Meaning, the highest levels for IFN-  $\gamma$  were observed at those times were low levels of Blimp1 and TLE4 were detected. Thus, these results suggest that Blimp1 and TLE4 could have a role in the control of IFN- $\gamma$  expression in response to M. tuberculosis stimulation. The mechanism of repression mediated for the Blimp1/TLE4 complex involves the recruitment of type I/II histone deacetylases (HDACs), DNA methyltransferases and histone methyltransferases at the IFNG locus. By using an HDAC inhibitor (MS-275), which specifically inhibits type I HDACs, we observed a significantly increase of IFN- $\gamma$  in M. tuberculosis stimulated cells. Therefore, this results demonstrate that histone deacetylation is one of the mechanisms that negatively regulate IFN- $\gamma$  production in response to M. tuberculosis, suggesting that the Blimp1/TLE4 repressor complex could be involved in the epigenetic control of IFN- $\gamma$  during M. tuberculosis infection, through the recruitment of HDACs to the chromatin. Taken together our results allow the identification of a genetic mark of

tuberculosis susceptibility and contribute with new mechanisms of genetic and epigenetic regulation of IFN- $\gamma$  in the immune response against *M. tuberculosis*.

**Keywords:** Tuberculosis, SNPs, IFN- $\gamma$ , SLAM, SAP, epigenetics



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES**

**Regulación genética y epigenética de la producción de IFN- $\gamma$  y su  
asociación con la susceptibilidad a la Tuberculosis.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes

Mención **CIENCIAS BASICAS Y APLICADAS**

**Lic. Guadalupe Inés Álvarez**

Director de tesis: Dra. Virginia Pasquinelli

Co-Director de tesis: Dr. Alejandro Castello

Consejero de Estudios: Dr. Marcelo Arguelles

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones y Transferencia del Noroeste de Buenos Aires. (CIT NOBA), Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas (CIBA), UNNOBA.





## Índice

Abreviaturas.....	11
Introducción.....	14
Tuberculosis .....	15
Diagnóstico y tratamiento.....	18
Respuesta inmune frente a <i>M. tuberculosis</i> .....	20
El granuloma, la marca registrada de la infección por <i>M. tuberculosis</i> .....	20
Respuesta inmune innata .....	23
Respuesta inmune adaptativa.....	26
Susceptibilidad genética y tuberculosis .....	32
Polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y susceptibilidad a enfermedad .....	34
Polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y susceptibilidad a la Tuberculosis .....	37
SNP +874 A/T (rs2430561) del gen del IFN- $\gamma$ .....	41
SNP s -262 A/T (rs2295614) y -188 A/G (rs2295613).....	41
SNP +1343 G/T (rs3796504) del gen de SLAM .....	42
SNP -346 C/T (rs12164382) del gen de SAP .....	43
Epigenética.....	44
Metilación del ADN .....	45
Modificaciones post-transcripcionales de Histonas .....	48
Acetilación de Histonas.....	49
Deacetilasas de Histonas (HDACs).....	50
Inhibidores de deacetilasas (HDACSi).....	50
Modulación epigenética del sistema inmune ¿Podemos ganar la batalla contra tuberculosis desde la epigenética? .....	52

Variaciones epigenéticas en el gen de <i>IFNG</i> .....	55
Metilación e IFN- $\gamma$ .....	55
Complejos de unión a la cromatina .....	58
Blimp1-TLE4 e IFN- $\gamma$ .....	61
Objetivos .....	64
Regulación genética de la producción de IFN- $\gamma$ y su asociación con la susceptibilidad a la Tuberculosis .....	65
Objetivo general.....	65
Objetivo s Específicos.....	65
Regulación epigenética de la producción de IFN- $\gamma$ y su asociación con la susceptibilidad a la Tuberculosis .....	66
Objetivo general.....	66
Objetivo s Específicos.....	66
Materiales y Métodos .....	67
Individuos participantes del estudio.....	68
Células y cultivos celulares.....	68
Antígeno.....	69
Genotipificación de Polimorfismos de nucleótido simple (SNP) .....	69
Extracción de ADN.....	69
SNP de IFN- $\gamma$ +874 A/T .....	69
SNPs de SLAM -262 A/T, -188 A/G y +1343 G/T.....	70
SNPs de SAP -631 A/G; -494 A/G y -346 C/T .....	71
Retro-transcripción y PCR en tiempo real.....	73
Metilación del sitio CpG -53 de IFN- $\gamma$ .....	76
ELISA.....	77
Ensayos con inhibidores de deacetilasas (iHDACs).....	77

Ensayos de Apoptosis celular .....	77
Análisis estadístico .....	78
Resultados.....	79
Determinación de SNPs- búsqueda de un haplotipo de susceptibilidad a la tuberculosis.....	80
Determinación del SNP de IFN- $\gamma$ +874 A/T .....	80
Estudio de los SNPs de SLAM -262 A/T; -188 A/G y +1343 G/T .....	85
SNPs de SLAM -262 A/T y -188 A/G .....	85
SNPs de SLAM +1343G/T .....	92
SNPs de SAP -631 A/G, -494 A/G y -346 C/T .....	934
Haplotipo de SAP.....	103
Haplotipo de IFN- $\gamma$ /SAP de susceptibilidad a la tuberculosis.....	106
Metilación del sitio CpG-53 de la región promotora del de IFN- $\gamma$ .....	107
Expresión del represor Blimp1 y del co-represor TLE4.....	110
Tratamiento con inhibidores de deacetilasas TSA, NaB y MS 275.....	114
Discusión .....	119
Conclusiones .....	138
Bibliografía .....	141
Agradecimientos .....	176

## Abreviaturas

ALPS	Síndrome linfoproliferativo auto-inmune
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CD	Célula Dendrítica
CMH	Complejo Mayo de Histocompatibilidad
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
DALD	Síndrome autoinmune linfoproliferativa de Diansani
Dnmts	Metiltransferasas
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DS	Dadores sanos
DUBs	Des-ubiquitinasas
E1/2/3	Enzimas de ubiquitinación
ELISA	Enzimo inmuno ensayo
HATs	Acetiltransferasas de histonas
HDACi	Inhibidores de deacetilasas
HDACs	Deacetilasas de histonas
HGH	Hormona de crecimiento humano
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IGRAs	Ensayos de liberación de IFN- $\gamma$
IL	Interleuquina

IP	Ioduro de propidio
KATs	Lisina acetiltransferasas
KDACs	Deacetilasas de lisina
KDMs	Demetilasas de lisina
KMTs	Lisina metiltransferasas
LBH589	Panobinostato
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LXA4	Lipotoxina A4
MAIT	Células T invariantes asociadas a las mucosas
MS-275	Benzamida
MSMD	Susceptibilidad mendeliana a enfermedades micobacterianas
NaB	Butirato de sodio
ng	nanogramos
NK	Células Asesinas Naturales
OR	Razón de probabilidades
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógeno
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RFLP	PCR-Polimorfismo de longitud de fragmento
PGE2	Prostaglandina E2
PPD	Derivado Proteico Purificado
PTB	Pacientes con tuberculosis activa
PXD101	Belinostato

SAHA	Hidroxámico suberoilánida
SAP	Proteína de unión a SLAM
SLAM	Molécula Linfocitaria Activadora de Señales
STAT1	Activador de la transcripción 1
STRs	Repeticiones cortas en tándem
TBL	Individuos con tuberculosis latente
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TLRs	Receptores Tipo Toll
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral-alfa
Treg	Células T regulatorias
TSA	Tricostatina A
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VNTRs	Repeticiones en tándem variables en número
XLP	Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

# Introducción



## Tuberculosis

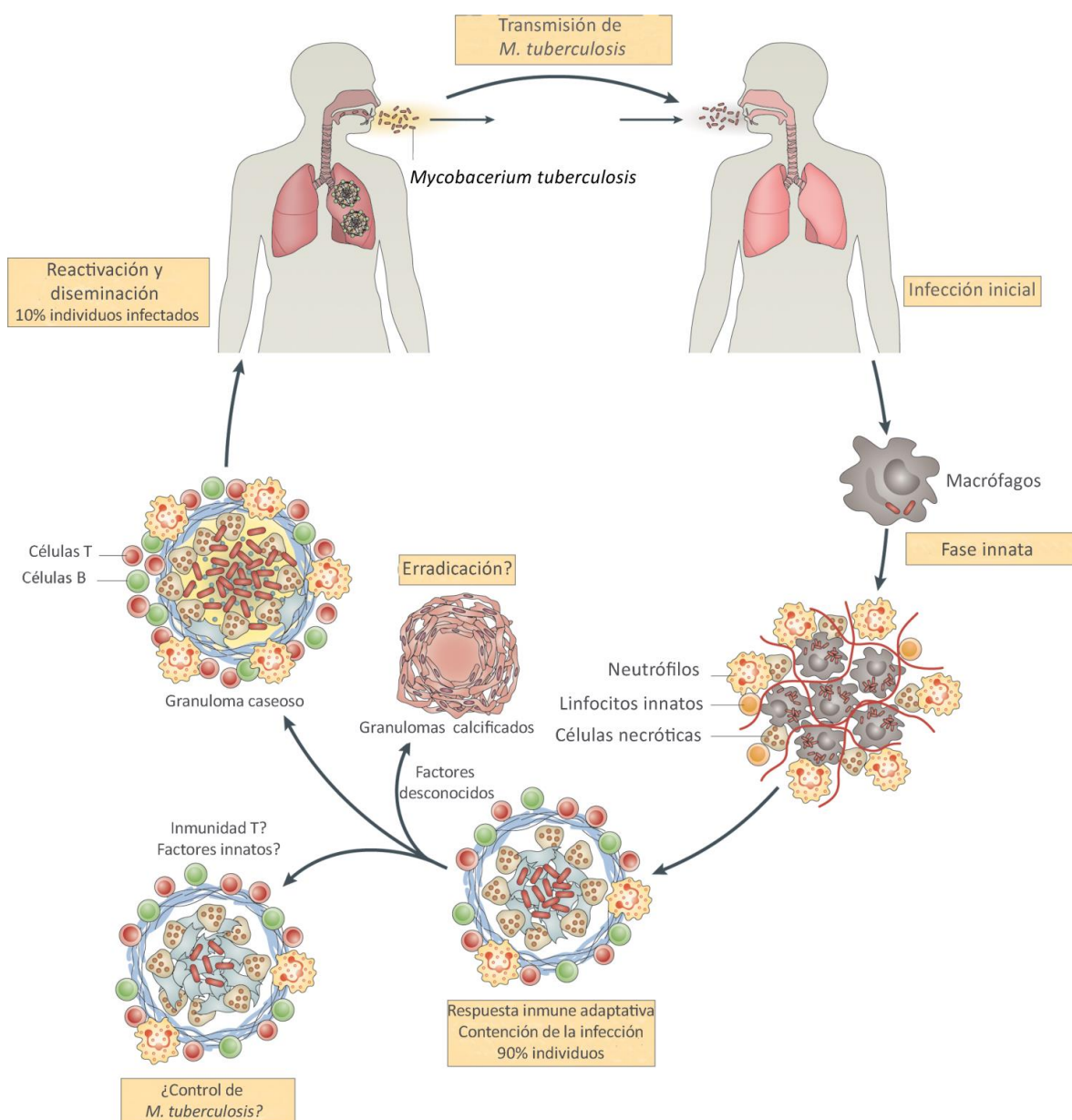
La tuberculosis, a pesar de ser una enfermedad curable, continúa siendo un grave problema para la salud mundial causando altos niveles de morbilidad y mortalidad, al igual que la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y la malaria. El agente causal de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* es uno de los patógenos humanos más exitosos debido a su capacidad para evadir los mecanismos de la respuesta inmune del huésped (1). Contribuyen a la problemática, una incompleta comprensión de la respuesta inmune, la falta de una vacuna efectiva (2, 3), la emergencia de cepas multi-resistentes a las drogas utilizadas en el tratamiento y la carencia de un método sensible y rápido para el diagnóstico (4). La organización mundial de la salud ha reportado 9 millones de nuevos casos y 1,5 millones de muertes en el año 2013 a pesar de las diversas estrategias implementadas por el Programa global de para erradicar la tuberculosis (The global plan to stop TB; <http://www.stoptb.org>).

Luego de la infección inicial con *M. tuberculosis* alrededor del 10% de los individuos progresan a la enfermedad activa, generalmente niños pero también puede ocurrir en adultos inmuno-comprometidos (5). Del 90% de los individuos restantes sólo del 3 al 10% desarrollan enfermedad durante el transcurso de sus vidas (6), ya que la mayoría contienen la infección en un estado subclínico conocido como infección latente (TBL), en donde el patógeno permanece en un estado quiescente (7). Estos individuos LTBI constituyen un reservorio de la enfermedad (7, 8). Como se describió previamente la reactivación de la infección puede darse muchos años después de la infección primaria, y aunque actualmente se desconoce exactamente el mecanismo responsable de la reactivación, está claramente asociado a factores del sistema inmune del



hospedador, ya que condiciones que afectan al mismo (co-infecciones, terapia con esteroides, edad avanzada, desnutrición, entre otras) favorecen el proceso de reactivación (**Figura 1**) (9). Ejemplos claros de esto se encuentran representados por las altas tasas de reactivación de la tuberculosis en individuos infectados con HIV y en pacientes con artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y psoriasis bajo tratamiento con bloqueantes del Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleuquinas 12 y 13 (IL-12 e IL-13) (8, 10).

La tuberculosis activa se caracteriza por una combinación de síntomas tales como fiebre, pérdida de peso, sudoraciones nocturnas y tos con sangre (hemoptisis), con anormalidades radiológicas como linfadenopatías torácicas y cavidades en el pulmón, reflejando la respuesta inmune del huésped al patógeno (11). El 70% de los individuos presentan tuberculosis pulmonar, sin embargo *M. tuberculosis* se puede diseminar a otros órganos incluidos los nódulos linfáticos, huesos y meninges causando enfermedad extra-pulmonar (12). El desarrollo de la enfermedad y las manifestaciones clínicas dependen de la interacción entre el ambiente, el huésped y el patógeno, además de los factores de riesgo tales como la co-infección con el virus del HIV, inmunodeficiencias, diabetes mellitus, malnutrición, sobre-población y pobreza en general (4).



**Figura 1. Patogénesis de la tuberculosis.** La infección es iniciada por la inhalación de microgotas de aerosol que contienen la bacteria. Los estadios iniciales de la infección se caracterizan por la respuesta inmune innata que involucra el reclutamiento de células inflamatorias al pulmón. Cuando las bacterias alcanzan los nódulos linfáticos secundarios, las células dendríticas (CDs) presentan los antígenos bacterianos a las células T vírgenes permitiendo la expansión de células T antígeno-específicas, las cuales son reclutadas al pulmón. El reclutamiento de células T, células B, macrófagos activados y otros leucocitos lleva al establecimiento de los granulomas, los cuales pueden contener a *Mycobacterium tuberculosis*. La mayoría de los individuos infectados permanecen en un estado de infección latente, en el cual no se presentan síntomas clínicos. Un porcentaje pequeño de estos individuos progresará eventualmente y desarrollará la enfermedad activa, lo cual puede llevar a la liberación de *M. tuberculosis* de los granulomas hacia las vías aéreas. Cuando los individuos con tuberculosis activa tosen pueden generar microgotas infectivas transmitiendo la infección.

## Diagnóstico y tratamiento

La presentación clínica clásica de la tuberculosis se solapa con otras enfermedades tales como la neumonía, cáncer de pulmón y sarcoidosis, llevando a un retraso del diagnóstico (13). La tuberculosis pulmonar es generalmente diagnosticada por la presencia de la micobacteria en el esputo por medio de examinación microscópica, esta técnica tiene una sensibilidad que varía entre el 32% y 97%, no distinguiendo entre *M. tuberculosis* y otras especies de micobacterias (14). Por lo tanto, se requieren seis semanas para el aislamiento y confirmación por cultivo (15). La Organización Mundial de la Salud aprobó recientemente el diagnóstico molecular para *M. tuberculosis* y resistencia a la rifampicina Xpert MTB/RIF (16). En los pacientes con tuberculosis activa en los cuales la microscopía del esputo y el cultivo no son posibles (17) (entre 30% y 50%) o en aquellos que tienen tuberculosis extra-pulmonar, es necesario otro tipo de muestreo invasivo como la broncoscopia o biopsia (18), que no siempre es posible en los países con alto índice de tuberculosis.

La prueba cutánea de la Tuberculina o reacción de Mantoux, es el test más ampliamente utilizado para el diagnóstico de infección por *M. tuberculosis*. La prueba consiste en la inyección intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis* (19). Sin embargo, este test posee confiabilidad limitada, especialmente en países donde la tuberculosis es endémica y aún se administra la BCG o donde los altos niveles de exposición a micobacterias ambientales llevan usualmente a test de PPD positivos (20). En los últimos años, han emergido nuevos ensayos de diagnóstico de latencia basados en la producción de IFN- $\gamma$  en muestras de sangre, luego de la reestimulación *in vitro* con antígenos específicos de *M. tuberculosis* tales como ESAT-6 y CFP-10, los cuales están ausentes en la BCG (21). Actualmente, estos ensayos de

liberación de IFN- $\gamma$  (IGRAs, por sus siglas en inglés) como el QuantiFERON<sup>®</sup>-TB se utilizan para identificar exposición previa a *M. tuberculosis* y, en países desarrollados, son considerados una herramienta de diagnóstico muy útil (22-25). Sin embargo, estos ensayos no distinguen entre individuos latentes e individuos con tuberculosis activa. Esta determinación depende de la identificación de síntomas clínicos y la positividad de las muestras de esputo, lo cuales poseen especificidad limitada. Por otro lado, la capacidad o habilidad para identificar aquellos individuos latentes con mayor riesgo de reactivación es fundamental para la implementación de terapias preventivas.

El tratamiento de la tuberculosis activa, requiere el uso de múltiples drogas y un mínimo de 6 meses, dividido en una fase inicial intensiva para eliminar los bacilos que se están replicando activamente, seguido de una fase que asegura que los bacilos persistentes sean también eliminados (26, 27). El único biomarcador aceptado es la conversión en un resultado negativo de la prueba de cultivo de esputo luego de dos meses de tratamiento (28). Sin embargo, un meta-análisis referido a la conversión del esputo reveló baja sensibilidad y modesta especificidad de esta medición para la predicción del éxito del tratamiento, excepto cuando se usa en ensayos clínicos durante largos períodos de tiempo (29). La radiografía de tórax es comúnmente utilizada para evaluar la respuesta al tratamiento, pero no está universalmente disponible y es difícil de estandarizar (30). La falta de un mecanismo de monitoreo de tratamiento efectivo puede llevar al desarrollo y dispersión de cepas multi-resistentes a drogas (30).

Por último, el estado de conocimiento actual acerca de la respuesta inmune frente a la infección por *M. tuberculosis* es pobre, lo cual dificulta el descubrimiento de nuevos tratamientos y nuevos métodos de diagnóstico (31). Mejorar nuestra comprensión de

la respuesta inmune permitirá determinar por qué algunos individuos expuestos a *M. tuberculosis* permanecen latentes y otros desarrollan la enfermedad. Estos conocimientos podrían también tener un fuerte impacto en el desarrollo de vacunas y herramientas terapéuticas y podrían proveer información para la identificación de marcadores de diagnóstico y pronóstico (31).

## **Respuesta inmune frente a *M. tuberculosis***

### **El granuloma, la marca registrada de la infección por *M. tuberculosis*.**

*M. tuberculosis* es un bacilo ácido alcohol resistente y fue identificado por primera vez por Robert Koch en 1882. La transmisión de la enfermedad se produce a través de microgotas de Flügge que se producen a través de la tos o el estornudo de individuos con enfermedad activa y que son inhaladas por un individuo sano (7, 32).

La infección comienza cuando los bacilos inhalados son fagocitados por los macrófagos alveolares, una vez dentro de los fagosomas, *M. tuberculosis* es capaz de prevenir la fusión con los lisosomas (33, 34). Esto marca el período de inicio de rápida división, donde la bacteria crece exponencialmente hasta que se monte la respuesta inmune. Esto es concomitante con el desarrollo del granuloma, que significa la contención de la infección por parte del sistema inmune (35). La principal marca de la tuberculosis activa es el granuloma, un microambiente inmune en el cual la infección puede ser controlada. Sin embargo, también provee un nicho en el cual *M. tuberculosis* puede sobrevivir, modulando la respuesta inmune para asegurar su supervivencia sin producir daño durante largos períodos de tiempo (36, 37).

El granuloma, tiene una base inflamatoria disparada por la respuesta inmune innata, pero luego evoluciona hacia una estructura mucho más compleja y dinámica, la cual es

mayormente dirigida por varios componentes de la respuesta Th1 de las células T. El granuloma no es una simple barrera de contención, sino que es una respuesta semi-simbiótica en la cual los mecanismos de defensa del hospedador y los mecanismos de supervivencia de la bacteria interactúan (38).

Un concepto prevalente en la literatura es que, una vez que la bacteria es atrapada dentro del granuloma, y se encuentra en condiciones de hipoxia, deprivación de nutrientes, así como también presión ejercida por la inmunidad adaptativa, las mismas se vuelven latentes. Sin embargo, múltiples estudios demuestran que el bacilo persiste en el centro del granuloma necrotizante, y es probablemente la fuente de la re-activación de la enfermedad (38). La respuesta inmune frente a la infección tiene lugar en las capas intactas del tejido dentro del granuloma, pero poco puede hacer frente al daño que tiene lugar en el centro del granuloma, lo cual lleva al hospedador hacia la utilización de otros mecanismos, tales como la calcificación para tratar de controlar la infección y luego sanar (38).

Ha sido propuesto que para que las células arriben al sitio de infección y comiencen a construir el granuloma, tres eventos claves deben ocurrir: primero el bacilo debe alcanzar el intersticio para disparar la respuesta inflamatoria (38). En segundo lugar las señales locales atraerán a las células dendríticas (CDs) y macrófagos al pulmón, pero para que la respuesta se amplifique los vasos adyacentes deberán expresar moléculas de adhesión e integrinas que puedan atraer células desde la sangre. El tercer proceso involucra el direccionamiento de estas células, y para esto es necesaria la producción de quemoquinas y de ciertas citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-17), un evento llevado a cabo por múltiples tipos celulares incluyendo macrófagos, neutrófilos y células T  $\gamma\delta$ . El

granuloma es un proceso dinámico, y cada vez más tipos celulares se mueven hacia él y la estructura crece en tamaño (38).

En el sitio de infección los macrófagos se diferencian en varios morfotipos incluidos células gigantes multinucleadas, células epiteloides y macrófagos espumosos cargados de gotas lipídicas (39-42). La estructura del granuloma se vuelve mucho más estratificada, una red fibrosa se forma por afuera de la capa rica en macrófagos y la mayoría de los linfocitos son excluidos del centro del granuloma (43).

Finalmente, el desarrollo progresivo del granuloma, la caseación y la necrosis, se atribuye normalmente a una respuesta de hipersensibilidad excesiva. Sin embargo, ha sido propuesto que eventos iniciales como la degranulación de los neutrófilos seguido del daño progresivo de las células endoteliales, sean probablemente la causa (38). Más aún, la expansión de la bacteria en los granulomas depende de la diseminación de la misma desde macrófagos muertos a macrófagos que están arribando al sitio de infección (44). El reclutamiento de los macrófagos favorece tanto a la bacteria como al hospedador. La inducción de la necrosis de los macrófagos o la lisis libera la bacteria intacta al medio extracelular. Estos debris necróticos o caseum, parecerían constituir un medio óptimo para el crecimiento de la bacteria. Ha sido demostrado que el exceso de TNF- $\alpha$  induce la muerte de los macrófagos a través de una vía llamada necroptosis (44).

Así es importante comprender que en cada paso de la infección, la bacteria parece inducir y beneficiarse de la respuesta del hospedador, utilizando incluso las vías inflamatorias que parecerían haber evolucionado para impedir el crecimiento de la bacteria. *M. tuberculosis* es el paradigma de un microorganismo adaptado al

hospedador, ha co-evolucionado con el sistema inmune humano desde hace cientos de años.

### **Respuesta inmune innata**

La mucosa de las vías aéreas representa la primera línea de defensa contra *M. tuberculosis* (45). Aunque la deposición de *M. tuberculosis* en los alvéolos es considerada la ruta primaria de entrada, ha sido también demostrado que la bacteria puede infectar células epiteliales del pulmón y que estas células infectadas dirigen la activación de células T invariantes asociadas a las mucosas (células MAIT), lo cual sugiere un rol de vigilancia de estas células en el reconocimiento de la infección primaria (46, 47).

Las células del epitelio de la mucosa y células de la respuesta inmune innata pueden reconocer patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) presentes en la superficie de *M. tuberculosis* a través de los receptores de reconocimiento de patrones tales como los receptores tipo Toll (TLRs), receptores de lectina tipo C como DC-SIGN y dectina 1, receptores tipo NOD, y receptores de manosa (48, 49).

Aunque el epitelio puede infectarse, los macrófagos alveolares son el blanco primario de *M. tuberculosis*, una vez que este ingresa al pulmón, la interacción entre *M. tuberculosis* y estas células es considerada crucial en la definición de la progresión de la infección. *M. tuberculosis* sobrevive en los macrófagos evitando la acidificación del compartimiento fagosomal e impidiendo la fusión del fagosoma con el lisosoma (34). Por lo que el bacilo se adapta al ambiente intracelular de los macrófagos y crea un nicho en el cual sobrevive. La manera en la cual los macrófagos responden luego de la infección con *M. tuberculosis* es crucial para la respuesta inmune del hospedador y el



desarrollo de la enfermedad. Tres resoluciones posibles son observados *in vitro* en macrófagos humanos o murinos luego de la infección con *M. tuberculosis*: 1) necrosis, una forma de muerte que es caracterizada por disrupción de la membrana plasmática; 2) apoptosis, una forma de muerte en la cual la membrana plasmática es preservada íntegramente; 3) supervivencia de los macrófagos infectados. De los tres eventos observados, *M. tuberculosis* induce predominantemente necrosis (50), mientras que la apoptosis permite el control de la replicación de la bacteria. Los macrófagos apoptóticos infectados son fagocitados por macrófagos no infectados en un proceso llamado eferocitosis el cual permite la eliminación eficiente del patógeno (51). El tipo de muerte celular inducida luego de la infección con *M. tuberculosis* es regulada por mediadores lipídicos eicosanoides, prostaglandina E2 (PGE2) y lipoxina A4 (LXA4) y esta regulación juega un importante rol en el desarrollo de la infección. Las cepas virulentas de *M. tuberculosis* evaden los mecanismos de la defensa innata del hospedador por medio de la inducción de LXA4 y la inhibición de la producción de PGE2, llevando a la inhibición de la apoptosis en los macrófagos y la dispersión de la micobacteria (52-54). Las CDs son también unos de los primeros tipos celulares en encontrarse con *M. tuberculosis*, tienen múltiples receptores para reconocer los PAMPs de la micobacteria y son altamente eficientes en la fagocitosis (55). Luego del encuentro con el antígeno las CDs presentes en el alveolo, maduran y presentan antígenos vía el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II a las células T en los nódulos linfáticos drenantes locales (56).

Los neutrófilos son el tipo celular predominante en las vías aéreas de los individuos con tuberculosis activa (57). Luego de la estimulación con *M. tuberculosis*, los neutrófilos secretan quemoquinas y citoquinas pro-inflamatorias llevando al

reclutamiento y la activación de otros tipos celulares (58). Estudios en contactos sanos de individuos con tuberculosis pulmonar activa demostraron que el riesgo de infección (no de enfermedad) correlacionaba inversamente con el número de neutrófilos en sangre en los individuos analizados; y que los neutrófilos eran por sí mismos antibacterianos (47, 59). Los neutrófilos poseen un rol protector en la respuesta temprana frente a *M. tuberculosis* a través de la inducción de la producción de IL-1 $\beta$ , TNF, defensinas, catelicidinas, lipocalina, NADPH oxidasa y superóxidos (60). Los neutrófilos también participan en la activación de los linfocitos T vírgenes e inducen la presentación cruzada de antígenos restringidos a clase I, lo cual es clave para la activación de las células T CD8 (60). Sin embargo, como se describió previamente cuando los neutrófilos mueren, el contenido pro-inflamatorio de sus gránulos puede ser liberado y promover la destrucción de tejidos.

Las células asesinas naturales (NK, del inglés natural killers) son reclutadas al sitio de infección tempranamente y juegan un rol importante en amplificar la defensa antimicrobiana. A través de los receptores NKp44, NKP46 y NKG2D (61), las células NK pueden reconocer y lisar macrófagos infectados (62). Estas células producen IFN- $\gamma$ , el cual activa a los macrófagos y pueden también secretar citoquinas que expandan las células T CD8+ y NKT (63).

Por último ha sido demostrado que células T no convencionales poseen un rol en la respuesta inmune frente a la tuberculosis. Estas incluyen las células MAIT mencionadas previamente, células NTK invariantes y células T  $\gamma\delta$ . Las células NKT reconocen antígenos de naturaleza lipídica presentadas por las moléculas CD1a y la deficiencia de esta población celular es asociada con el desarrollo de tuberculosis activa (64). Las células T $\gamma\delta$  presentes en el alveolo, se caracterizan por reconocer fosfoantígenos de *M.*

*tuberculosis* (65) y participan en la eliminación de macrófagos infectados a través de los gránulos citotóxicos.

### **Respuesta inmune adaptativa**

Una vez que se inicia la respuesta adquirida, las células deben migrar desde la circulación hacia el parénquima del pulmón y luego hacia el sitio infectado, el cual está compuesto mayormente por macrófagos y CDs las cuales expresan una variedad de funciones efectoras (47). El problema con esta migración es que ocurre sólo luego de 7–9 días luego de la infección inicial (47). Como consecuencia, existe un retraso de alrededor de 18-20 días antes de que las células T antígeno-específicas se acumulen en número suficiente en el pulmón para frenar el crecimiento bacteriano. Incluso luego de la vacunación, cuando existe una población de células T de memoria circulantes, esta acumulación de células T antígeno-específicas se acelera sólo por cinco días, y *M. tuberculosis* todavía tiene 15 días para definir la lesión del pulmón antes de que las células T arriben (47).

Ha sido demostrado que la migración de los linfocitos depende de la secreción de las quemoquinas CXCL13, CCL19 y CCL21 (47). Así la ubicación de las células T antígeno específicas en el pulmón depende de la expresión de quemoquinas y receptores de quemoquinas. Para interactuar con los macrófagos infectados y controlar el crecimiento de la micobacteria, las células T deben dejar la vasculatura y migrar hacia lesión dominada por los macrófagos (47). La expresión de CXCR3 ha sido asociada con la capacidad de las células T de ingresar al parénquima y CXCR5 es requerido por las células T para migrar hacia el sitio infectado dentro del parénquima. La expresión focal de CXCL13 en el pulmón, la cual está asociada con la generación de folículos B

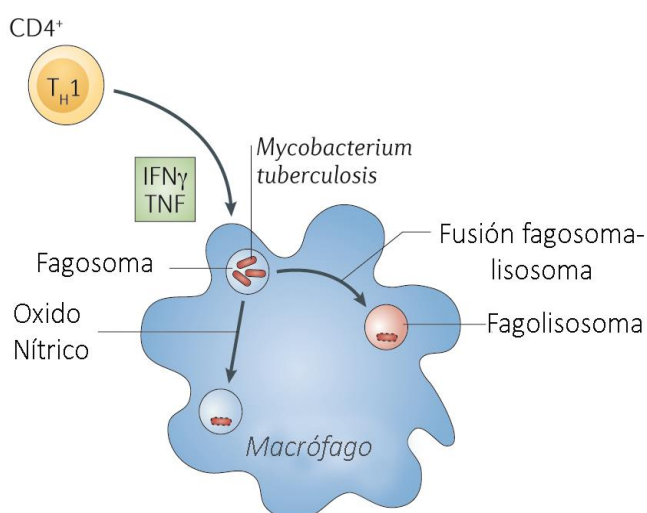
cercanos a los sitios inflamados, es requerida para la localización óptima de las células T lejos de la región perivascular y cerca de la lesión (47).

Así es claro que, aunque se logre la inducción de grandes números de células T antígeno específicas diferenciadas, esto no será suficiente si estas células no tienen la capacidad de ingresar al parénquima pulmonar y luego migrar a la región correcta dentro del pulmón. Otro interrogante es ***¿qué capacidades funcionales, qué fenotipo deben tener las células T para conferir protección frente a la tuberculosis?***

Durante las últimas cuatro décadas, el paradigma predominante ha sido que el IFN- $\gamma$  (interferón gamma) producido por las células T CD4 media la inmunidad protectora frente a la tuberculosis. La utilización de los ratones “knockout” en los años 90 estableció un rol crucial para las células CD4 y permitió identificar roles adicionales para las células T CD8, NKT invariantes y células T  $\gamma\delta$  (60). El rol central del IFN- $\gamma$ , una citoquina involucrada en la respuesta frente a virus y bacterias intracelulares, en la inmunidad frente a *M. tuberculosis* se basa en la susceptibilidad extrema que presentan los ratones que carecen de IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  es capaz de activar a los macrófagos e inducir la muerte de las bacterias intracelulares mediante la activación de vías antimicrobianas efectoras, incluyendo la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), GTPasas inducibles, la maduración del fagosoma y su acidificación, la inducción de la autofagia y la señalización a través del receptor de la vitamina D (60). Estudios genéticos han confirmado el rol del IFN- $\gamma$ : familias con mutaciones en la vía IL-12, IFN- $\gamma$  y el activador de la transcripción 1 (STAT1) desarrollan infecciones diseminadas causadas por BCG y micobacterias no tuberculosas (60). Esta susceptibilidad heredable, conocida como susceptibilidad mendeliana a enfermedades micobacterianas (MSMD), revela la naturaleza crucial de esta vía de señalización, la

cual fue originalmente descrita en el modelo de ratón (60). Así estos descubrimientos han ayudado a definir el “dogma central de la inmunidad frente a la tuberculosis (Figura 2): la producción de IFN- $\gamma$  por las células T activa a los macrófagos para matar a *M. tuberculosis*.

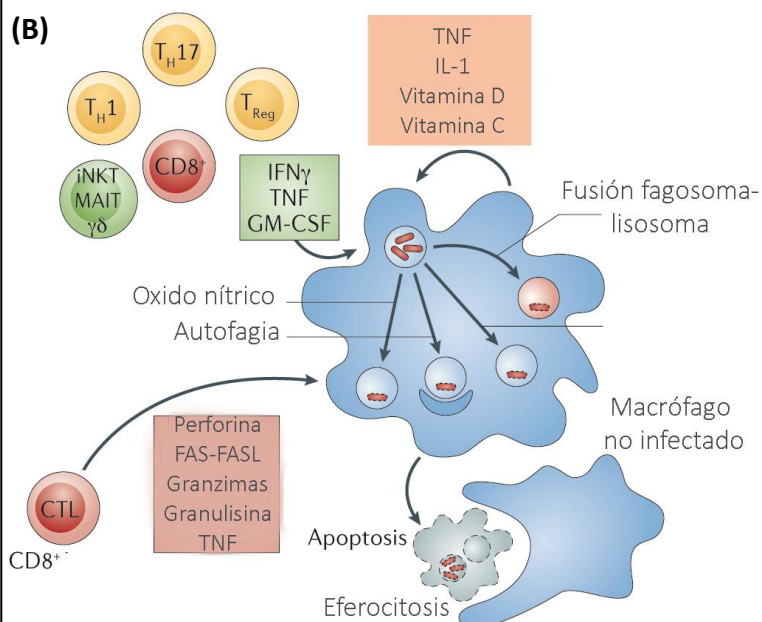
(A)



**Figura 2A.** El dogma central de la inmunidad protectora frente a la tuberculosis es que las células T CD4 producen IFN- $\gamma$  (células Th1), el cual actúa de manera sinérgica con el TNF- $\alpha$  (producido por macrófagos y células T), y activan la capacidad microbicida de los macrófagos los cuales son entonces capaces de restringir el crecimiento de *M. tuberculosis*. Dos vías activadas por el IFN- $\gamma$  son capaces de inducir la muerte de *M. tuberculosis*: la producción de óxido nítrico y la fusión del fagosoma con el lisosoma, el cual acidifica el fagosoma bacteriano.

**Figura 2b.** Una visión revisada del dogma central incorpora subpoblaciones de células T adicionales (células T CD4, CD8+ T y células T no convencionales: células T  $\gamma\delta$ , células MAIT y células T restringidas a CD1) e incluye mecanismos adicionales por las cuales las células T median la muerte de *M. tuberculosis*. Estos incluyen citoquinas adicionales (como GM-CSF) y la citólisis de macrófagos infectados. El mecanismo citolítico varía y puede incluir gránulos citotóxicos, los cuales secretan péptidos antimicrobianos, como la granulicina, pero también pueden secretar granzimas, la cual dispara la apoptosis. La actividad citotóxica T (CTL) es mediada por FASL-FAS o TNF y puede llevar también a apoptosis. La apoptosis puede tener un efecto beneficioso en la resolución de la infección, dado que las células apoptóticas son fagocitadas por macrófagos no infectados los cuales son capaces de destruir las células apoptóticas y las bacterias intracelulares. Finalmente varios componentes de la respuesta inmune innata incluyendo a la IL-1 y vitaminas, pueden actuar sinérgicamente con las citoquinas producidas por las células T

(B)



Sin embargo, la mayoría de las personas que desarrollan la enfermedad activa no presentan defectos evidentes en sus compartimentos T y generan respuestas específicas frente a *M. tuberculosis* con producción de IFN- $\gamma$ , lo cual demuestra que la producción de IFN- $\gamma$  es importante pero no suficiente para el control de *M. tuberculosis*. Más aún, no se sabe cuánto IFN- $\gamma$  es necesario, cuáles son las células requeridas para producirlas y si más es mejor (60). Por otro lado, en muchas infecciones crónicas como la tuberculosis, el daño tisular mediado por la respuesta inmune debe ser regulado para que no resulte en detrimento del hospedador. Los mecanismos que contra-regulan la respuesta pro-inflamatoria y previenen los efectos dañinos de la inflamación excesiva pueden también disminuir la respuesta inmune protectora. Las células T regulatorias (Treg) suprimen la inflamación y limitan la respuesta inmune a través de la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), y por contacto directo con las células a través de moléculas inhibitorias de la superficie. Luego de la infección por *M. tuberculosis* se generan Tregs en humanos, primates no humanos y en ratón. La eliminación de estas células en ratón puede mejorar la inmunidad protectora; sin embargo, si esto ocurre en detrimento de riesgo de mayor daño tisular no ha sido evaluado (60).

Por otro lado, aunque el IFN- $\gamma$  es una citoquina pro-inflamatoria, también limita la inflamación, al menos en parte por inhibición directa e indirecta de los neutrófilos. El IFN- $\gamma$  puede tener efectos anti-proliferativos en las células T y modular su función, incluyendo la inhibición de células T CD4 productoras de IL-17, la cual media la inflamación neutrofílica (66). Más aún, el IFN- $\gamma$  actúa directamente en los neutrófilos inhibiendo su acumulación en el pulmón (60). De hecho, infiltrados de neutrófilos en el

pulmón han sido considerados como un signo de falla de la respuesta Th1, lo cual lleva a una destrucción acelerada del tejido durante la infección crónica por *M. tuberculosis* (60, 67). De manera similar, el NO (indispensable para el efecto anti-microbiano del IFN- $\gamma$ ) restringe la inflamación a través inhibición del ensamblado del inflamasoma NLRP3, lo cual inhibe la producción de IL-1 $\beta$  por los macrófagos (68). En conjunto, estos resultados demuestran que las células T cumplen un rol central influenciando el balance entre señales pro y anti-inflamatorias. Además, refuerzan la idea de que la función de las células T CD4 y en particular del IFN- $\gamma$  es mucho más amplia que la activación de los macrófagos y es necesaria para una inmunidad óptima durante la infección por *M. tuberculosis*. Así, el IFN- $\gamma$  funciona como un regulador negativo de la inmunidad innata, incluyendo neutrófilos e IL-1 $\beta$ , los cuales pueden ser beneficiosos en la respuesta temprana frente a *M. tuberculosis* pero tendrían efectos perjudiciales si persisten durante la fase crónica de la infección (60). Teniendo en cuenta estos antecedentes en el presente trabajo de tesis evaluamos los mecanismos que regulan la producción de esta citoquina central en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*.

***Pero ¿qué determina la diferenciación de un linfocito T hacia su perfil Th1 productor de IFN- $\gamma$ ?*** Para la activación apropiada de los linfocitos T vírgenes y su diferenciación hacia los distintos linajes efectores Th se necesitan tres señales: la señal uno disparada por la interacción entre el CMH-péptido de la CD y el TCR; la segunda señal es provista por la interacción de moléculas coestimuladoras expresadas sobre las CDs, con sus ligandos específicos localizados sobre las células T y la señal tres o de polarización requiere de la presencia de citoquinas y es el resultado de la unión de productos microbianos o señales de peligro endógenas con receptores tales como los TLR. Ha

sido propuesto que las células NK o células T  $\gamma\delta$ , podrían ser las células productoras de IFN- $\gamma$  para la polarización Th1. Respecto de la segunda señal, nuestro grupo de trabajo ha reportado previamente que varias moléculas co-estimuladoras son capaces de modular la respuesta T efectora en pacientes con tuberculosis activa. En particular, resultados previos de nuestro grupo de trabajo demuestran que la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM) es capaz de inducir la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis* (69-71). Más aún los pacientes con tuberculosis que presentar una mayor severidad de la enfermedad expresan menores niveles de SLAM en respuesta a la estimulación con *M. tuberculosis* (69). Más aún, la proteína de unión a SLAM (SAP) inhibe la producción de IFN- $\gamma$  inducida por SLAM (69-71).

Por último es importante destacar que además de la producción de citoquinas, las células T, particularmente las células T CD8, tienen la capacidad de matar células que reconocen como extrañas. *M. tuberculosis* dispara las respuestas T CD8. Tres vías diferentes median la actividad citotóxica de estas células: exocitosis de gránulos citotóxicos que contienen proteínas que causan la lisis y apoptosis de las células blanco, tales como perforina, granulicina y granzimas; FAS o el ligando de FAS (FASL), los cuales median señalizaciones de muerte; y TNF. Las tres vías inducen la apoptosis de las células blanco, lo cual se asocia con viabilidad reducida de las bacterias. Como se describió previamente, la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por macrófagos no infectados (eferocitosis) lleva a la rápida asociación de la bacteria atrapada en el cuerpo apoptóticos (eferosoma) con el lisosoma y a la muerte de *M. tuberculosis* (60). Finalmente, es importante considerar que sólo el 10% de los individuos infectados desarrolla la enfermedad activa, lo que nos lleva a pensar que la inmunidad natural funciona bien, incluso cuando no lleva a esterilización. Pero, ¿qué pasa en el 10% de



los individuos que desarrollan la enfermedad? Aunque la progresión a la enfermedad sintomática puede deberse a inmunodeficiencias adquiridas (causadas por el SIDA, bloqueantes de TNF, corticosteroides, auto-anticuerpos, etc), en muchos casos, individuos inmunocompetentes también desarrolla tuberculosis activa, lo cual indicaría una falla de su sistema inmune para controlar la infección (60). Los individuos que han sido tratados previamente por tuberculosis poseen un mayor riesgo de desarrollar episodios adicionales de la enfermedad (60, 72). ¿Puede esto ser atribuido a episodios de reincidencia luego de tratamientos inadecuados? O ¿tienen estos individuos un defecto en su sistema inmune que podría explicar por qué desarrollan la enfermedad en primer lugar? Para lograr el desarrollo de una vacuna efectiva necesitamos comprender por qué estos individuos son susceptibles al desarrollo de la tuberculosis. Estos individuos, de presentar un defecto en su respuesta inmune, podrían no responder normalmente a las vacunas o ser resistentes a sus efectos.

**Si no comprendemos por qué los individuos son susceptibles a la enfermedad no podemos predecir cómo protegerlos.**

## **Susceptibilidad genética y tuberculosis**

La infección por *M. tuberculosis* durante largos períodos de tiempo sobre la raza humana sugiere una poderosa presión evolutiva entre los genomas del hospedador y el patógeno (73-75). Las frecuencias de las distintas variantes genéticas detectadas en estudios de asociación con la susceptibilidad a la tuberculosis son probablemente resultado de una fuerte selección evolutiva a favor de la resistencia a esta enfermedad en las distintas poblaciones analizadas (76). La observación de que los europeos tienen una mayor resistencia a tuberculosis que las poblaciones de ascendencia africana

subsaharica, ha sido atribuida al mayor período de tiempo que los europeos han sido expuestos a *M. tuberculosis* en comparación con los africanos. Similarmente, un estudio realizado en un hogar de ancianos en los Estados Unidos mostró que las personas de ascendencia africana estaban infectados con *M. tuberculosis* dos veces más que las personas de ascendencia europea en el mismo ambiente (77). Todas las secuencias del genoma humano, disponibles actualmente en la web, deben ser probadas por su historia evolutiva tanto por eventos evolutivos como la deriva génica aleatoria o cuello de botella como bajo presión de selección, por ejemplo a microorganismos. Esto último se puede descifrar mediante métodos estadísticos por estimación de probabilidad de que una variante dada y su haplotipo asociado se hayan acumulado a un ritmo más rápido de lo esperado. Cuando se detecta tal evidencia, los genes deben ser el foco de estudio futuro (76).

*Mycobacterium tuberculosis* es el patógeno más importante del género *Mycobacteria*. Como se mencionó anteriormente, es estimado que un tercio de la población mundial está infectada con esta bacteria, de los individuos infectados, sólo el 10% desarrolla la enfermedad activa. Esto lleva a preguntarse ¿Cuál es la diferencia en aquellos individuos que padecerán la enfermedad? En 1926, en Lubeck Alemania 249 bebés fueron accidentalmente vacunados con una cepa virulenta de *M. tuberculosis* en lugar de la tradicional vacuna BCG, solamente 173 bebés sobrevivieron. Esto es un indicio de que la mayoría de la población tiene resistencia innata efectiva a la tuberculosis. Los factores genéticos explican al menos en parte por qué algunas personas son más o menos susceptibles a la infección. Varias líneas de evidencia incluyen estudios en hermanos gemelos (78-80), estudios de ligamiento de genoma completo (genome-wide linkage studies) (79, 81-85) y estudios de asociación de genomas completos

(genome-wide association studies -GWAS) (86-88), los cuales demuestran que la genética del hospedador influye fuertemente en la susceptibilidad a la tuberculosis. Más aún, las diferencias significativas en la incidencia de tuberculosis en diferentes regiones, grupos étnicos y poblaciones indicarían que existen factores genéticos responsables por de la susceptibilidad a la tuberculosis. La incidencia más elevada de tuberculosis es en Asia (58%), seguido por África (27%), la Región mediterránea del Este (8%), la Región Europea (4%) y la la Región de las Américas (3%).

Sin embargo, la evaluación de la contribución y la consecuencia funcional de variaciones genéticas específicas (polimorfismos) del genoma humano a la susceptibilidad o resistencia a la tuberculosis sigue siendo un desafío para la investigación en genética de poblaciones.

### **Polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y susceptibilidad a enfermedad**

Cualquier cambio en la secuencia nucleotídica, usualmente pero no siempre atribuido a ser causante de enfermedad, se denomina “mutación” (89). Las mutaciones usualmente pueden originarse del ADN dañado no reparado, a partir de errores de replicación o son consecuencia de elementos genéticos móviles (transposones). Una mutación que ocurre en la población en una frecuencia mayor al 1% se denomina “polimorfismo” (90). La elevada incidencia en la población sugiere que un polimorfismo puede tener un efecto neutro o beneficioso.

El tipo de mutación más simple es aquella que ocurre cuando se produce el cambio puntual de un solo nucleótido en una posición determinada de la secuencia del ADN y si supera el 1% de su frecuencia en una determinada población, es denominada

polimorfismo de nucleótido simple (SNP). Los SNPs fueron detectados en la década del 80, los mismos se distribuyen diferencialmente a lo largo de todo el genoma humano concentrándose en regiones muy densas con un SNP cada 50 o 100 pares de bases (pb) intercalándose con regiones de menor densidad que poseen un SNP cada 100 a 1000 pb. Los SNPs son una gran fuente de variabilidad especialmente cuando están ubicados en exones (secuencias codificantes) alterando la secuencia de los aminoácidos traducidos (SNP no-sinónimos). Los SNPs también se pueden localizar en regiones no codificantes intergénicas o intragénicas y en esta localización pueden afectar la expresión génica a nivel transcripcional, por ejemplo al estar presentes en un sitio puntual de unión de un factor de transcripción (SNP sinónimos) (91). En términos evolutivos, los SNPs sinónimos y aquellos que se localizan en la región génica no codificante son generalmente más comunes que aquellos que generan cambios no sinónimos reflejando una gran presión selectiva reduciendo la diversidad en las posiciones que determinan la identidad de los aminoácidos. Además existe una enorme diversidad en la frecuencia de SNPs entre los distintos genes reflejando, nuevamente diferente presión de selección sobre cada gen así como diferentes tasas de mutación y recombinación a lo largo del genoma (92). En cuanto a la frecuencia de los SNPs en diferentes poblaciones, esta información es actualizada en sitios de internet conocidos como dbSNP (del inglés, SNP database) <http://www.ncbi.nih.gov/SNP>, en el sitio consorcio de SNPs <http://snp.cshl.org/> y en el sitio del proyecto internacional de mapeo de haplotipos <http://www.hapmap.org/>.

Para llevar a cabo estudios de caso-control usando genes candidatos, es necesario que estos genes demuestren implicancia biológica consistente en el desarrollo de la enfermedad. Para testear estos genes es necesario el uso de marcadores genéticos

tales como las repeticiones cortas en tándem (STR, del inglés short tandem repeats), número variable de repeticiones en tándem (VNTRs del inglés variable number of tandem repeats) o los SNPs. Todos estos son utilizados en estudios genéticos, los STRs y VNTRs son multialélicos, más costosos económicamente y más dificultosos para genotipificar, sin embargo los SNPs son bialélicos y simples de caracterizar por lo que son los más utilizados en la actualidad.

El principal objetivo de los estudios epidemiológicos, tales como los estudios de caso-control es inferir la causalidad entre un marcador genético y la presencia o severidad a una enfermedad. Para ello se comparan dos grupos de personas: aquellos que son identificados con la enfermedad (caso) y el segundo grupo conformado por individuos no enfermos (control). El siguiente paso consiste en comparar ambos grupos y determinar si el marcador genético está asociado a la enfermedad para lo cual se utiliza el estadístico razón de proporciones (OR del inglés, odds ratio). El OR se calcula como el cociente de la probabilidad de poseer la marca genética y estar enfermo o no enfermo. Si el OR es el mismo para los dos grupos es decir si el valor es 1, no existe asociación entre el marcador genético y la enfermedad; si los valores oscilan de 0 a 1, el marcador confiere protección y si es mayor a 1, el marcador genético es un factor de riesgo a la enfermedad. El OR puede tomar valores de 0 al infinito (91).

Además de la elección de los métodos de detección de SNPs se debe decidir la población sobre la cual se va a realizar el estudio de polimorfismo. Como se mencionó anteriormente las frecuencias alélicas varían considerablemente entre las distintas poblaciones humanas y grupos étnicos, según los eventos evolutivos a la que cada una estuvo expuesta. El consorcio de SNP ha optado por el uso de un panel étnicamente diverso para maximizar la posibilidad de hallar SNPs.

## **Polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y susceptibilidad a la Tuberculosis**

Varios SNPs fueron estudiados en asociación con la tuberculosis en moléculas involucradas en la respuesta inmune innata. Entre las moléculas más estudiadas se incluyen los receptores de membrana, como los receptores de manosa (MR, CD206), receptores de las CDs (DC-SIGNo CD209), dectina-1, TLRs, receptor del complemento 3 (CR3, CD11b/CD18), receptores intracelulares como NOD1 y NOD2 y el receptor de la vitamina D (76).

Estudios de asociación de SNPs en NOD2 y la susceptibilidad a la tuberculosis han sido ampliamente reportados por varios autores alrededor del mundo. NOD2 es un miembro de la familia de NLRs y está codificado en el cromosoma 16q21, este reconoce por medio de regiones ricas en leucina a los muramil dipéptidos que son un componente de los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana e inducen la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias para eliminar la bacteria intracelular. Sin embargo los resultados de asociación entre los SNPs de NOD2 y la susceptibilidad a la tuberculosis son inconsistentes y poco concluyentes debido al limitado número de muestras y a las diferentes poblaciones en estudio. Interesantemente en un estudio reciente *Wang y colaboradores*, (93) realizaron un estudio de meta-análisis basándose en 5 artículos. El meta-análisis reveló asociación entre el alelo T del SNP Arg702Trp y la protección a la tuberculosis (93). A su vez, el estudio demostró que diferentes grupos étnicos contribuyen de diferente manera a la susceptibilidad a la tuberculosis. Así por ejemplo, el alelo G del SNP Arg587Arg que es una marca de riesgo a la tuberculosis en el grupo étnico Han de la población china, mientras que no se halló asociación en las etnias Kazak y Uygur (93). Otro de los SNPs ampliamente estudiados en relación a la

susceptibilidad a la tuberculosis son los del receptor de la vitamina D (VDR). La 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub>, la forma activa de la vitamina D es expresada en macrófagos y otras células del sistema inmune, se une al VDR para modular la respuesta frente a la infección por *M. tuberculosis* (94). Se han estudiado principalmente cuatro SNPs potencialmente funcionales en el gen de VDR de acuerdo al riesgo de tuberculosis (ApaI, SNP ID: rs7975232; BsmI, SNP ID: rs1544410; FokI, SNP ID: rs2228570; and TaqI, SNP ID: rs731236). Estudios de meta-análisis conducidos por *Gao y colaboradores*, reportaron asociación significativa de los polimorfismos de ApaI y TaqI con el riesgo a tuberculosis (95), pero estos hallazgos necesitan ser validados en muestras de mayor tamaño. Recientemente *Cheng Chen y colaboradores* realizaron un meta-análisis incluyendo 29 estudios reportados, de los cuales 17 fueron conducidos en Asia, 7 en África y 5 en Europa y América (96). En este meta-análisis fueron evaluados SNPs (ApaI y BsmI) cercanos a la región no traducida 3' UTR y SNPs (FokI y TaqI) en la región codificante. Los estudios demostraron que el SNP FokI incrementa significativamente el riesgo de tuberculosis y este efecto de riesgo en la población china (96). Las otras tres variantes no fueron asociadas de manera significativa a un efecto de riesgo o protección a la tuberculosis en el total de población evaluada. Sin embargo, en la estratificación de la diferentes etnias, hallaron que el SNP BsmI genera un efecto protector en la tuberculosis en la población europea.

Los SNPs en los TLRs son otro de los grupos de moléculas ampliamente estudiadas en la búsqueda de marcadores genéticos de susceptibilidad a la tuberculosis. Muchas de las publicaciones acerca de los SNPs en genes que codifican para los distintos tipos de TLRs son inconsistentes. *Zhang y colaboradores* (97) realizaron un estudio de meta-análisis en el cual se demuestra que el SNP G2258A para el TLR2 está asociado con un

incremento en el riesgo de tuberculosis, especialmente en asiáticos y europeos, TLR1 G1805T está asociado con un incremento de tuberculosis en africanos y en Hispanoamericanos y TLR6 C745T está asociado con un decrecimiento en el riesgo de tuberculosis. Mientras que los polimorfismos en TLR2 T597C y TLR2 T1350C no demostraron asociación significativa con la tuberculosis (97). Más aun recientemente fue demostrado que el polimorfismo rs352139 del TLR9 podría estar asociado con un menor riesgo a tuberculosis en indonesios, mientras que se asocia a mayor riesgo a la tuberculosis en mexicanos (98).

Además de los genes asociados con la respuesta inmune innata un gran número de estudios han reportado asociación entre polimorfismos en la moléculas de HLA de clase II y la susceptibilidad a la tuberculosis (99). Un reporte interesante mostró la asociación del polimorfismo en el residuo 57 de la proteína DQ $\beta$ 1 (100). El alelo Asp57 de DQ $\beta$ 1 se asocia con un riesgo incrementado de progresión a tuberculosis pulmonar (100). Interesantemente, este alelo muestra una capacidad reducida de unirse a péptidos inmunogénicos de *M. tuberculosis* los cual podría debilitar las respuestas Th1 (100). Además de los estudios con este alelo de DQ $\beta$ 1, diversos estudios en diferentes poblaciones han demostrado asociación de la tuberculosis con haplotipos en las proteínas DQ y DR (99).

Por último, como se describió previamente los estudios realizados en las enfermedades con susceptibilidad Mendeliana a las micobacterias (MSMD) resaltan el rol crítico del IFN- $\gamma$  y de sus vías de señalización en la infección por *M. tuberculosis*. Como se describe más adelante uno de los SNPs más estudiados para el IFN- $\gamma$  es el SNP +874 A/T. Sin embargo, este SNP no ha sido estudiado en Argentina.



Por último es importante destacar que aunque numerosos estudios examinan los factores genéticos de riesgo a la tuberculosis, estamos recién comenzando a dilucidar el rol de la genética del hospedador en la susceptibilidad a la tuberculosis. Más aun, existen pocos estudios que se han focalizado en la resistencia a la infección o en los individuos con infección latente (LTBI); estos estudios podrían ayudarnos a entender las causas genéticas que determinan que estos individuos infectados permanezcan saludables (101).

**Teniendo en cuenta la importancia del IFN- $\gamma$  en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*, en el presente trabajo de tesis evaluamos si SNPs presentes en moléculas de señalización que modulan la producción de esta citoquina en respuesta a *M. tuberculosis* podían estar asociadas con la susceptibilidad a la tuberculosis. Para esto evaluamos los SNPs -262 A/T, -188 A/G y +1343 G/T de SLAM y -631 A/G, -494 A/G y -346 C/T de SAP. Así como también el SNP +874 A/T del gen del IFN- $\gamma$ . A continuación se describen brevemente los reportes previos más importantes relacionados con los SNPs estudiados.**

### **SNP +874 A/T (rs2430561) del gen del IFN- $\gamma$**

El SNP +874 A/T fue reportado por primera vez en el año 2000 (102). Se halla localizado en el primer intrón, en el extremo 5' de la región microsatélite CA. Ha sido sugerido que este polimorfismo puede influenciar la secreción de IFN- $\gamma$  con el consiguiente impacto en la capacidad resolutive de la tuberculosis. La presencia del alelo T predispone a la unión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, mientras que el alelo A reduce la afinidad y por lo tanto la expresión del gen en respuesta a estímulo. Así, el genotipo AA o simplemente el alelo A ha sido asociado a bajos niveles de producción de IFN- $\gamma$ , contrariamente el genotipo TT o el alelo T se asocia a con mayor producción de esta citoquina y el genotipo AT con niveles intermedios. Este SNP fue estudiado en varias poblaciones alrededor del mundo, en algunas de ellas detectándose asociación con la tuberculosis como ocurre en las poblaciones sicilianas (103), brasileras (104), china (Hong Kong)(105), población pediátrica de Egipto (106) y española (107). Más aún diferencias significativas para este SNP han sido encontradas en un meta-análisis realizado considerando 11 publicaciones en diferentes poblaciones (108).

### **SNP s -262 A/T (rs2295614) y -188 A/G (rs2295613)**

No han sido reportados muchos SNPs en el gen de SLAM. Los SNPs -262 A/T y -188 A/G de SLAM han sido estudiados en lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de auto-anticuerpos, activación de complemento y deposición de inmuno-complejos (109). El LES es resultado de la combinación de factores genéticos y ambientales, con un patrón de herencia complejo en el cual intervienen múltiples genes (110). Una serie de genes han sido asociados con esta enfermedad los cuales incluyen a IRF5 (111), ITGAM (112) , STAT4 (113), PDCD1

(114), y PTPN22 (115). Estudios de mapeo genético en lupus murino han identificado en el cromosoma 1 el locus Sle1b y el cluster de genes de la familia SLAM y 12 SNPs no sinónimos. Además se encontró asociación de 2 haplotipos de la familia de genes SLAM/CD2 y susceptibilidad a autoinmunidad en ratones B6.Sle1b, esta autoinmunidad podría deberse a la combinación de los genes del cluster 12 de la familia SLAM/CD2. De acuerdo a estos antecedentes *You y colaboradores* (116) investigaron la asociación funcional de los SNPs -262 A/T y -188 A/G de SLAM en pacientes con lupus en donde los alelos A (-262) y G -188 fueron altamente frecuentes respecto del grupo control. Más aún en respuesta a estimulación con PHA, la expresión del ARNm de SLAM en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LES fue significativamente mayor en los individuos con el haplotipo homocigota -262A-188G comparado con individuos con el haplotipo heterocigota e individuos con otros genotipos.

### **SNP +1343 G/T (rs3796504) del gen de SLAM**

SLAM además actúa como receptor del virus del sarampión junto con CD46. Ha sido demostrado que el dominio extracelular V de SLAM es necesario y suficiente para la unión de la proteína hemaglutinina del virus (117). La hemaglutinina además interacciona con CD46 uniéndose a una secuencia repetitiva consenso corta (SCRs 1 y 2) en la región extracelular de este receptor (118). Aislamientos clínicos y cepas de vacunas del virus del sarampión son capaces de infectar las células diana a través de SLAM. De acuerdo a estudios realizados, variaciones genéticas en el sitio de unión del virus de sarampión en SLAM y CD46 pueden influenciar la expresión de estos receptores y el desarrollo de la respuesta inmune a la vacuna y a la infección. El SNP +1343 G/T se localiza en el exón 7 y genera una mutación no sinónima, un cambio de

un aminoácido treonina por prolina en la posición 333. *Dhiman y colaboradores* (119) han reportado la asociación de este SNP con la producción de anticuerpos en respuesta a la infección con el virus del sarampión en humanos que han recibido dos dosis de la vacuna. La presencia del alelo T (heterocigota GT) disminuye 4 veces la producción de anticuerpos en comparación con el genotipo homocigota GG, por lo que se trata de un efecto alelo dosis dependiente.

### **SNP -346 C/T (rs12164382) del gen de SAP**

SAP es una proteína adaptadora con un dominio de homología Src de tipo 2 (SH2). Se expresa en células T, NK, NKT, eosinófilos, plaquetas y algunas poblaciones de células B (120). SAP regula las funciones de varios receptores de la familia SLAM a través de la unión a su cola citoplasmática. El gen de SAP (*SH2D1A*) se localiza en el cromosoma X (Xq25–q26) y consiste de cuatro exones y 3 intrones con un tamaño de 25 kilobase (kb). Mutaciones deletéreas de *SH2D1A* causan el síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP), el cual se caracteriza por una incapacidad para montar una respuesta inmune efectiva frente al virus de Epstein–Barr. Ha sido observado que en colonias de ratones deficientes en Fas (MRLlpr/lpr, modelo de LES), una mutación espontánea en el gen *SH2D1A* que causa la pérdida de expresión de SAP resultó en protección parcial de la enfermedad (121), lo cual sugiere una relación opuesta epistática entre los defectos en Fas y SAP. Teniendo en cuenta estos antecedentes *Boggio y colaboradores*, evaluaron el rol de SAP en pacientes con síndrome linfoproliferativo auto-inmune (ALPS), los cuales presentan funciones defectivas de FAS (122). Los autores encontraron que estos pacientes presentaban una frecuencia incrementada de alelo T del SNP -346 C/T en *SH2D1A*, el cual causa una pérdida del

sitio de metilación -346C y se correlaciona con expresión de SAP incrementada y una producción disminuida de IFN- $\gamma$  (122).

## **Epigenética**

La epigenética, definida como cambios heredables en la expresión génica no atribuibles a variaciones en la secuencia nucleotídica del ADN (123, 124), ha emergido como un campo prometedor en los últimos años. El estilo de vida, el estrés, las drogas, situaciones fisiopatológicas e intervenciones farmacológicas, entre otros, tienen un alto impacto pudiendo alterar el código epigenético normal de las células. Muchas enfermedades, incluidas el cáncer, enfermedades autoinmunes, y enfermedades infecciosas están asociadas a alteraciones epigenéticas. Las terapias con drogas estándar no son siempre eficientes en todos los pacientes, probablemente debido a variaciones genéticas como los SNPs, las cuales pueden llevar a una mayor predisposición a padecer ciertas enfermedades. Sumado a la genética, el factor ambiental también debe ser considerado en la determinación de susceptibilidad a una determinada patología, como se mencionó anteriormente el epigenoma puede ser alterado por diversas situaciones ambientales llevando a la expresión alterada de ciertos genes en ciertos tipos celulares. El epigenoma conecta al genoma con el ambiente celular y determina la identidad y funcionalidad celular (125).

Los tres eventos principalmente involucrados y los más estudiados en la regulación epigenética son: la metilación del ADN, las modificaciones post-transcripcionales de las histonas y los ARNs no codificantes; estos mecanismos actúan en conjunto para

establecer una estructura abierta o cerrada de la cromatina y definir la transcripción activa o no de los genes (125).

## **Metilación del ADN**

La metilación del ADN es una modificación química covalente que resulta en la adición de un grupo metilo en la posición 5' de la base nucleotídica citosina desde la base S-adenosilmetionina por las metiltransferasas Dnmt1, Dnmt3A y Dnmt3B. Tiene un gran efecto en la expresión génica y es esencial para el desarrollo en mamíferos. Los sitios CpG están sub-representados y desigualmente distribuidos a lo largo de todo el genoma, dando lugar a regiones de baja densidad de CpG intercaladas con grupos de CpG que se agrupan en regiones denominadas "islas CpGs" (126). No todos los sitios CpG están metilados. El patrón de metilación es tejido-específico y está involucrado en varios procesos fisiológicos claves como la inactivación del cromosoma X, "imprinting" genómico, en el silenciamiento de genes específicos de la línea germinal y de elementos repetitivos. Sin embargo, este patrón de metilación puede ser perturbado en importantes enfermedades humanas, como el cáncer, por lo que entender cómo se generan y son mantenidos es de gran importancia.

El patrón de metilación es establecido durante el desarrollo embrionario y es heredado en las células somáticas (127, 128), cuando un dinucleótido CpG metilado es replicado, la citosina de la hebra naciente esta inicialmente no metilada, las "metiltransferasas de mantención" son las encargadas de copiar el patrón de metilación establecido en las primeras etapas embrionarias, por las metiltransferasas "de novo" (129). La existencia de dos tipos de enzimas metiltransferasas es característica de organismos eucariotas, ya que en los procariotas existe una única metiltransferasa que es igualmente efectiva para ADN no metilado, como hemimetilado.

Dnmt3a y Dnmt3b, las metiltransferasas “*de novo*”, fueron clonadas en el año 1999 (130), estas enzimas demuestran similar actividad tanto en ADN hemimetilado como en no metilado. Están altamente expresadas en células madres embrionarias y reguladas negativamente en células diferenciadas, sin embargo, continúan expresándose en células somáticas. Mutaciones en el gen *DNMT3B* son responsables de una enfermedad poco común en humanos, el síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad de la región centromérica y anomalías faciales (ICF). Una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por inmunodeficiencia variable, anomalías faciales y descondensación centromérica en los cromosomas 1, 9 y 16 asociada a la hipometilación anormal de sitios CpG en regiones satélite pericentroméricas (131, 132). Dnmt1, la metiltransferasa de mantención fue clonada en el año 1988 (133) y demostró una marcada preferencia por el ADN hemimetilado (134, 135), sin embargo, también posee actividad de metiltransferasa “*de novo*” (136). Está altamente expresada durante la fase S del ciclo celular (fase de replicación del ADN) (137), momento en cual es requerida para metilar los sitios hemimetilados en las cadenas nacientes. Experimentos con ratones “knockout” demostraron que esta enzima es responsable de la metilación de la mayoría de las células y es esencial para el desarrollo embrionario (138).

La presencia de las islas CpG en el ADN de los mamíferos también plantea varias preguntas con respecto al mantenimiento de la condición de metilación en las células somáticas. A pesar de que están representadas en menos del 1% del ADN genómico total, reciben gran atención debido a su localización preferencial en el sitio de inicio de la transcripción (>50% en genes humanos). Independientemente del estado de expresión génica, la mayoría de las islas CpG permanecen no metiladas en las células

somáticas, con excepción de los genes del cromosoma X inactivado, genes específicos en células germinales y en la minoría de los genes (139). ¿A qué se debe este estado mayoritario de demetilación? A menudo se plantea la hipótesis de que están de alguna manera "protegidos" de metilación, sin embargo, son de fácil acceso para el agregado exógeno de metilasas de ADN. Por ejemplo, las islas CpG no metiladas en los genes p16, MLH o GRP78 son rápidamente metiladas cuando se agrega exógenamente a la cromatina la ADN metilasa Sss1 (140, 141). Esta observación sugiere que si existieran metiltransferasas de ADN libre en el núcleo de las células, las islas CpG serían instantáneamente metiladas "de novo". Esto de hecho no ocurre, sugiriendo entonces que las metiltransferasas de ADN no se encuentran libres en las células eucarióticas, sino que estarían secuestradas en compartimientos nucleares con el objetivo de cumplir funciones específicas dentro del núcleo (142). Por otra parte, la demetilación activa podría ser además un mecanismo para "limpiar" la metilación aberrante que pudiera ocurrir durante la división celular. Hasta el momento, no existe una clara evidencia de las demetilasas de ADN (143). Sin embargo, recientes estudios sobre la 5-hidroximetilcitosina en ADN de mamíferos (144) y la demostración de que la proteína TET puede oxidar la 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina (145) proveen una posible ruta para la demetilación activa.

Por más de dos décadas se han acumulado evidencias que llevan a la metilación del ADN como un marcador para el diagnóstico. Específicamente, las metilaciones aberrantes fueron el primer marcador epigenético asociado a cáncer llevando a la alteración en la regulación génica normal (146). Esta hipermetilación anormal ha sido correlacionada con el silenciamiento génico, sugiriendo la aplicabilidad de esta patrón de metilación aberrante en el promotor de estos genes al diagnóstico y monitoreo



clínico en varios tipos de cáncer (123). La hipermetilación de la región promotora de los genes ha sido la marca epigenética más estudiada, no solo en cáncer sino también en otras enfermedades humanas, como desórdenes metabólicos, autoinmunidad, enfermedades neurológicas y cardiovasculares (147, 148). Desde el punto de vista clínico la aplicación de la metilación del ADN para el diagnóstico presenta varias ventajas cuando es comparado con otros tipos de biomarcadores, como mutaciones genéticas o perfiles de expresión génica. En contraste a los biomarcadores basados en la expresión génica, las alteraciones de hipermetilación del ADN son principalmente encontradas en regiones exactas (islas CpG) y puede ser detectada por un amplio rango de técnicas sensibles y eficientes (149).

### **Modificaciones post-transcripcionales de Histonas**

El nucleosoma, componente básico de la cromatina, consiste en 146 pares de bases de ADN enrollados alrededor de un octámero de proteínas histonas (H2A, H2B, H3 y H4). En contraste al ADN que solamente puede ser modificado por metilación, las histonas pueden ser modificadas por metilación, acetilación, fosforilación, biotilación, ubiquitinación, sumolación y ADP ribosilación. Las modificaciones de las histonas ocurren en el extremo N-terminal constituido por 15 a 38 aminoácidos. Muchas de las modificaciones, pero no todas son reversibles. Muchas enzimas involucradas en las modificaciones de las histonas han sido identificadas, incluidas las acetiltransferasas de histonas (HATs) también conocidas como lisina acetiltransferasas (KATs), las deacetilasas de histonas (HDACs) también conocidas como deacetilasas de lisina (KDACs), lisina metiltransferasas (KMTs), demetilinas de lisina (KDMs) y las enzimas de ubiquitinación (E1, E2 y E3) y las des-ubiquitinasas (DUBs). Estas enzimas usualmente

forman complejos y son ATP dependientes (150). Los residuos de lisina pueden ser metilados (mono-, di o tri-) o acetilados y los residuos de arginina pueden ser mono o di-metilados (151). El estado de acetilación resulta del balance entre HAT y HDACs (152). La metilación de las histonas es mantenida por metiltransferasas y demetilinas de histonas. La fosforilación ocurre en residuos de treonina y serina; la sumolación en residuos de lisina (153). Estas modificaciones post-transcripcionales de las histonas pueden afectar directamente la compactación y el ensamblado de la cromatina o pueden servir como sitios de unión para otras proteínas efectoras, incluidas otras proteínas modificadoras o complejos remodeladores de la cromatina, todos estos en última instancia influyen en el inicio de la transcripción.

### **Acetilación de histonas**

La acetilación de histonas es la modificación más ampliamente estudiada. Es reversible, y ocurre en los residuos de lisina en las posiciones 9, 14, 18 y 23 de la H3 y en las posiciones 5, 8, 12 y 16 de la H4 presentes en el extremo N-terminal. Media la descondensación de la estructura del nucleosoma alterando la interacción del ADN y las histonas, facilitando de este modo el acceso y la unión de factores de transcripción. Las HATs y HDACs regulan el estado balanceado de acetilación de histonas. Los inhibidores de HDACs (HDACi) han sido reconocidos como potenciales agentes terapéuticos para el cáncer, ya que inducen arresto del ciclo celular y apoptosis (154, 155). La acetilación de histonas está altamente asociada con la inflamación, las HDACs regulan genes de citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-5, IL-8 e IL-12 y de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 (156).

## **Deacetilasas de histonas (HDACS)**

Las HDACS son componentes del complejo de silenciamiento transcripcional primeramente descrito como mRpd3/N-CoR /mSin3 (157). Hasta el momento se han caracterizado cuatro clases diferentes de HDACS divididas en 18 subtipos (158-160). La sobre-expresión de las HDACS ha sido relacionada con una variedad de tipos de cáncer humanos (159); por ejemplo HDAC1 en cáncer gástrico (161) o cáncer de mama (162), HDAC3 en cáncer de colon (163) y HDAC6 también en cáncer de mama (164).

## **Inhibidores de deacetilasas (HDACSi)**

Varios agentes químicos que actúan como inhibidores de HDACS han sido desarrollados y están siendo probados en ensayos clínicos (158, 160); sólo el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) ha sido aprobado para uso clínico en pacientes con linfoma cutáneo de células T por la FDA (165, 166). Generalmente, hidroxamatos tales como el vorinostat, panobinostato (LBH589), trichostatina A (TSA) o belinostato (PXD101) son HDACSi inespecíficos con actividad contra las HDACS de clases I, IIa, IIb y IV (167). Otras HDACSi específicamente inhiben HDACS de clase I, por ejemplo la benzamida (MS-275) o los ácidos grasos de cadena corta como el ácido valproico o el butirato de sodio (NaB) los cuales inhiben a las HDACS de clase I y IIa (167, 168). Todas las clases de HDACSi llevan al arresto de la fase G1/S del ciclo celular aumentando la expresión del inhibidor de quinasas ciclina dependiente  $p21^{cip1/waf1}$  a través del incremento de la acetilación de histonas en la región promotora y de los sitios Sp1 de  $p21^{cip1/waf1}$  desplazando al represor HDAC1 en su sitio de unión. La expresión de este gen es regulada de un modo p53 dependiente o independiente (154, 159, 169). Los HDACSi son potentes inductores de la apoptosis en células tumorales humanas.

Interesantemente, estos agentes inhibidores demuestran alta especificidad para células tumorales por mecanismos de acción que aún se desconocen del todo. Los HDACSi inducen apoptosis celular activando ambas vías de apoptosis, la extrínseca (mediada por TRAIL) y la intrínseca (relacionada a la mitocondria); por ejemplo por regulación positiva de los receptores de muerte (Hdr4, Hdr5) o por supresión de las proteínas de la familia bcl-2 (170-172). Muchos de estos efectos son mediados por el control transcripcional a través de la hiperacetilación de p53, factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en la apoptosis y arresto del ciclo celular (173). Otros efectos pro-apoptóticos de los HDACSi como ser la generación de especies reactivas del oxígeno, también contribuyen a estos efectos (174, 175). Los HDACSi también han sido asociadas con una variedad de efectos inmuno-moduladores tales como la hiperacetilación de los factores de transcripción STAT1, STAT3 o NF- $\kappa$ B y la subsecuente modulación de las vías inflamatorias río abajo (176, 177). La inhibición de las HDACS es ahora bien establecida como una nueva aproximación para la terapia contra tumores sólidos y hematológicos (178-180). Varios estudios con diferentes HDACSi muestran actividad de amplio espectro contra las células cancerígenas tales como la activación de vías pro-apoptóticas y la inhibición de vías anti-apoptóticas, inducción de la diferenciación celular y actividad anti-angiogénica (181-183). Todos estos efectos no podrían ser resultado solamente de la regulación transcripcional. Otros sustratos además de las HDACS tales como los factores de transcripción STAT1 o STAT3, la proteína de shock térmico Hsp90, p53 o  $\alpha$ -tubulina han sido descritas (184-186).

## **Modulación epigenética del sistema inmune ¿Podemos ganar la batalla contra tuberculosis desde la epigenética?**

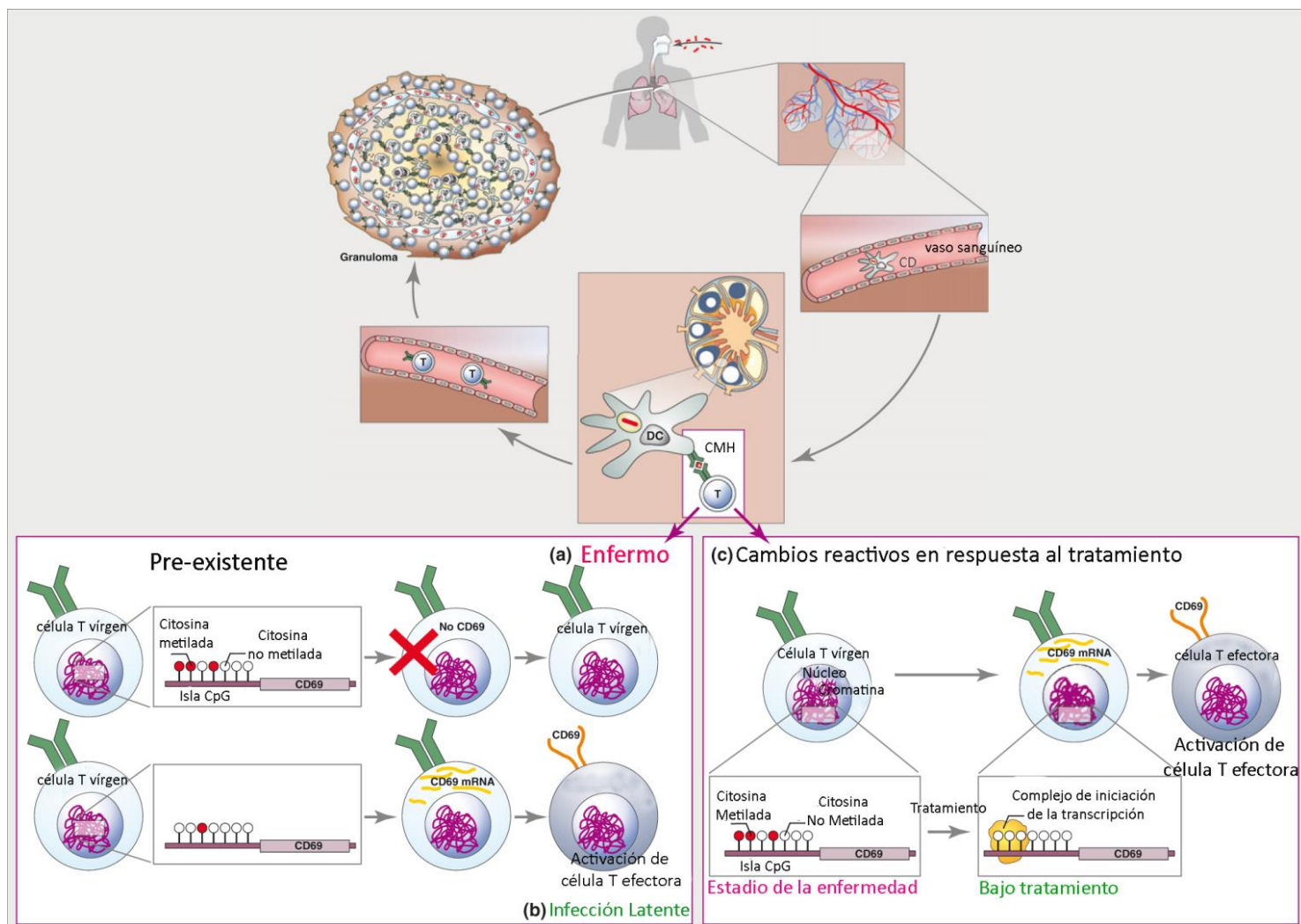
Los cambios en la estructura de la cromatina como resultado de las modificaciones epigenéticas descritas previamente están involucrados en funciones críticas de la respuesta inmune, tales como la generación de monocitos, CD4, la diferenciación y plasticidad de las células Th colaboradoras CD4 y células Tregs, el establecimiento de los fenotipos de memoria y la producción de anticuerpos por células plasmáticas (125). Ha sido propuesto que en tuberculosis, una marca epigenética, tal como la metilación del ADN, la cual es relativamente estable podría ser explotada como un biomarcador para discriminar entre individuos con infección latente y aquellos con enfermedad activa, o incluso como un marcador pronóstico (187). Más aún, ¿podría una “firma” comprometiéndose diferentes marcadores ser establecida para detectar cambios epigenéticos que indiquen riesgo de activar la enfermedad o de recurrencia de la enfermedad? Además de un rol causal potencial en los procesos patogénicos, alteraciones epigenéticas, tales como las metilaciones “*de novo*”, podrían también ocurrir como una consecuencia directa o indirecta de la enfermedad y servir entonces como biomarcadores de actividad de la enfermedad (**Figura 3**). La tuberculosis, el SIDA y la malaria tienen un fuerte componente genético en términos de la susceptibilidad del hospedador a la enfermedad clínica, lo cual es fuertemente influenciado por el ambiente (187). Debido al rol central del epigenoma en permitir la plasticidad fenotípica del sistema inmune y a su capacidad de mediar entre el ambiente y los fenotipos celulares, ha sido propuesto que la susceptibilidad a la tuberculosis tendría

un componente de predisposición epigenética (187). Sin embargo son muy pocos los estudios reportados al respecto.

Más aún, ha sido propuesto que los análisis epigenéticos podrían revelar cambios epigenéticos reactivos como resultado directo o indirecto de la infección (187).

Naturalmente es tentador especular acerca de nuevas medidas de intervención, dado el éxito de moduladores epigenéticos en el tratamiento del cáncer; sin embargo el desarrollo de “epidrogas” para el tratamiento de infecciones aún no ha sido explorado.

Necesitamos una mejor comprensión del epigenoma en la tuberculosis (tanto del hospedador como del patógeno), no solo para lograr una mejor comprensión de cómo funciona el sistema inmune en el contexto de la enfermedad infecciosa sino también para desarrollar nuevas herramientas que nos permitan combatir la tuberculosis más eficientemente.



**Figura 3.** Escenario hipotético que ilustra los efectos de cambios pre-existentes o reactivos en la metilación del ADN en genes involucrados en la función de las células T y el desarrollo de la enfermedad en individuos infectados con tuberculosis. En los individuos infectados con *M. tuberculosis*, las células dendríticas (CD) cargan los antígenos y migran hacia los nódulos linfáticos, donde activan a las células T vírgenes. Luego las células T activadas migran al foco de infección. (a) Paciente con mayor susceptibilidad al desarrollo de tuberculosis activa: el ADN de las células T está metilado en el área del promotor, por ejemplo de CD69. Por lo que estas células no expresan suficiente CD69, impidiendo la maduración de las células T efectoras. (b) Paciente con menor susceptibilidad a activar la enfermedad porque el promotor de CD69 en las células T no está metilado y es accesible al complejo transcripcional. Esto permite la maduración de las células T que ayudan a mantener la infección latente. (c) Cambios reactivos en la metilación del ADN durante la infección. El promotor de CD69 es metilado en células T vírgenes. Luego de la infección, la metilación en este sitio es eliminada, permitiendo la adecuada activación transcripcional, expresión de CD69 y maduración de las células T efectoras. Luego del tratamiento exitoso para erradicar la infección por *M. tuberculosis*, la metilación en el promotor de CD69 posiblemente puede incrementarse y retornar a la línea basal en ausencia de la necesidad de células T efectoras. En este escenario, la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento puede ser monitoreada por análisis de la metilación del promotor de CD69. Este es un ejemplo hipotético, CD69 fué utilizado sólo a modo de ilustración. La reacción del hospedador a la infección con *M. tuberculosis* y la respuesta al tratamiento es mucho más compleja.

## Variaciones epigenéticas en el gen de *IFNG*

Existe amplia bibliografía relacionada con el estudio de las modificaciones epigenéticas que ocurren en *IFNG* durante la diferenciación de células T a Th1 (productoras de IFN- $\gamma$ )/ Th2 (no productoras de IFN- $\gamma$ ). La metilación en sitios CpG específicos dentro del gen de *IFNG* en células T vírgenes se pierde durante la diferenciación a Th1, lo cual se asocia a la cromatina descondensada y a un incremento en la producción de IFN- $\gamma$ , contrariamente a lo que ocurre en las células Th2 donde el promotor permanece hipermetilado (188). Las células Th1 muestran acetilación de la histona H4 y metilación de la H3K4 (189), mientras que las células Th2 muestran di-metilación y tri-metilación de la histona H3K27, pero no acetilación (188, 190).

## Metilación e IFN- $\gamma$

Numerosos trabajos reportan cambios en el patrón de metilación en el gen de *IFNG* durante la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> hacia el perfil Th1 y Th2. Los dinucleótidos CpG de *IFNG* en las células T CD4 vírgenes presentes en las regiones intrónicas, en casi todas las regiones distales CNS (secuencias conservadas no codificantes), excepto en la región promotora se hayan altamente metilados (188). Existen varias ADN metiltransferasas (DNMT) responsables de la metilación del ADN. Es generalmente asumido que las DNMT1 son necesarias para mantener la metilación de *IFNG* en las células T CD4 en el estado indiferenciado (191). En contraste, las DNMT3a catalizan la metilación del promotor de *IFNG* en respuesta a las señales para la diferenciación hacia el linaje Th2 y Th17 de manera tal de mantener silenciado este gen, inclusive frente a la re-exposición a señales de diferenciación Th1 (192). Además, para evaluar la importancia de la metilación del promotor de *IFNG* se han realizado



ensayos reporteros con luciferasa que demostraron que la metilación del vector del promotor de *IFNG* inhibe su actividad transcripcional (193, 194).

La metilación de varios sitios CpG de *IFNG* han sido evaluados, los sitios -212, -198 y -178 individualmente no afectan la actividad del promotor, y un pequeño efecto fue observado cuando los sitios -50 y -39 son exclusivamente metilados. Sin embargo la modificación del sitio -53 reduce significativamente la actividad a un nivel similar al observado en el ensayo del vector completamente metilado (194). Es de destacar además, que durante la polarización Th1/Th2 la metilación en el sitio -53 ocurre más rápidamente que en otros, siendo muy superior para el linaje Th2 (193, 194). Por lo que este sitio -53 podría potencialmente inhibir la transcripción de *IFNG*.

En los últimos años se han realizado varios estudios de los factores epigenéticos que regular la expresión del gen que codifica para IFN- $\gamma$ . Específicamente la metilación de *IFNG* ha sido estudiada en una amplia gama de enfermedades que van desde el asma a la periodontitis. Algunas de ellas asociadas con una disminución (hipo-) o con un incremento (hiper-) en el estado de metilación del promotor de *IFNG*, las cuales son mencionadas a continuación.

*Runyon, R.S y colaboradores* (195), analizaron las células T efectoras de gemelos asmáticos y demostraron un incremento en los niveles de metilación y disminución de la expresión de *IFNG*, respecto de sus gemelos no asmáticos. Similarmente, la hipermetilación de *IFNG* fue hallada en el ADN de sangre entera de trabajadores con asma ocupacional inducida por disocianato. El estado de metilación del promotor de *IFNG* podría ser un método sensitivo y específico para el diagnóstico de este tipo de asma en los trabajadores expuestos a este agente químico (196).

Otras enfermedades están asociadas con la metilación y la expresión de *IFNG*. La presión sanguínea es negativamente asociada con la metilación de *IFNG*. Según los autores, este y otros resultados apoyan la hipótesis de que la metilación en genes pro-inflamatorios puede desempeñar un papel en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares en ancianos (197). Por otro lado, se reportó hipometilación del promotor de *IFNG* en células T CD4+ de infantes con artresia biliar, una enfermedad autoinmune que se origina en los primeros días de vida como consecuencia de una infección viral hepato-biliar (198). La sobre-expresión de IFN- $\gamma$  indica que esta citoquina podría tener un importante rol en mediar la patogénesis de esta enfermedad a través de las células T CD4+ (198). Hipometilación de la región promotora del gen de *IFNG* fue reportada en muestras de biopsias gingivales en sitios de periodontitis crónica (199). Estos sitios están mayormente poblados de células T CD4+, CD11C+ y células NK CD56+, en relación a muestras de individuos sanos. El IFN- $\gamma$  producido por estas poblaciones celulares incrementa la actividad de fagocitos, monocitos y neutrófilos, los cuales ayudan a contener la infección. Sin embargo, la sobre-expresión de esta citoquina asociada a la hipometilación, puede conducir directa o indirectamente a la destrucción del tejido a través de la activación de los fagocitos (199).

Interesantemente, también ha sido reportado que la metilación del gen de IFN- $\gamma$  puede ser modificada por factores microbianos. El HIV causa hipermetilación y silenciamiento de *IFNG*, posiblemente como estrategia para evadir la respuesta inmune (200). Mientras que la hipometilación de *IFNG* se ha hallado en células B transformadas por el virus de Epstein-Barr (201). En relación a esto, ha sido sugerido que bajos niveles de

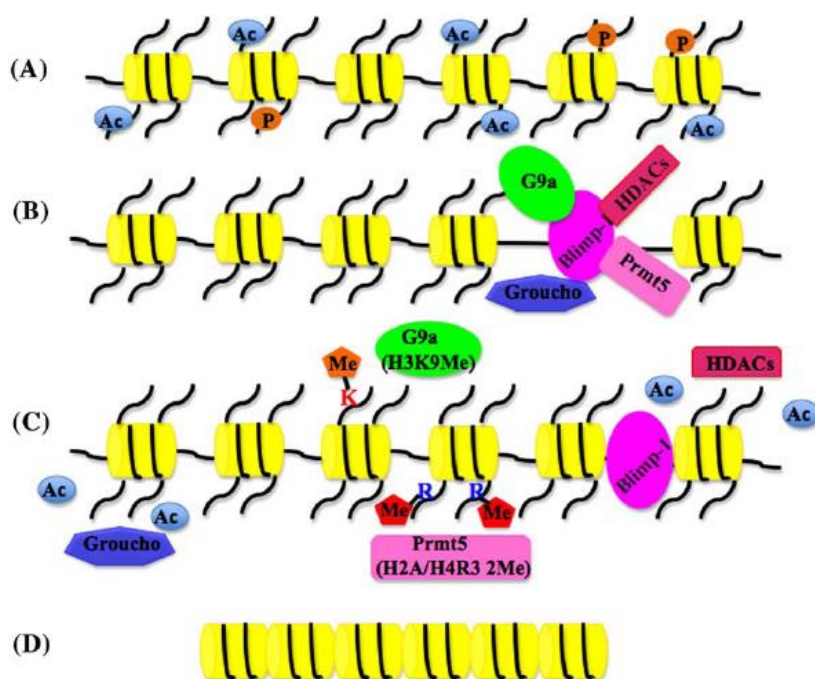
exposición microbiana durante las etapas tempranas de vida pueden reducir la demetilación de *IFNG* en células T vírgenes, reduciendo la activación de este gen.

### **Complejos de unión a la cromatina**

La transcripción génica está altamente regulada a diferentes niveles para asegurar que el transcriptoma sea el apropiado para la etapa de desarrollo y tipo celular implicado. El estado de la cromatina en el cual está incluido un determinado gen determina en gran medida su nivel de expresión. La activación o la represión de la transcripción es típicamente acompañada del reclutamiento de complejos proteicos de asociación a la cromatina que combinan varios elementos moleculares tales como aquellos que se unen directamente a las histonas o aquellos que poseen actividad modificadora de las mismas (202).

La proteína inductora de la maduración de los linfocitos B (Blimp1) esta codificada por el gen *Prdm1* y forma parte de la familia de proteínas Prdm que contiene 16-17 miembros identificados en mamíferos, todos los cuales se caracterizan por la presencia del dominio PR (PRDI-BF1 y RIZ) y un número variable de dedos zinc. Blimp1 tiene cinco dedos zinc de unión al ADN, pero sólo los dos primeros parecen ser requeridos para unirse a las secuencias blanco del ADN (203). Blimp1 emplea múltiples mecanismos para actuar como represor transcripcional. Varios dominios de la proteína Blimp1 reclutan una serie de enzimas modificadoras de la cromatina o complejos co-represores específicos para mediar el silenciamiento génico. Específicamente Blimp1 se asocia con proteínas co-represoras incluidas metiltransferasas de histonas (G9a y PRMT5) proteínas de la familia de Groucho y deacetilasas de histonas (**Figura 4**). Este reclutamiento de proteínas represoras a diferentes genes blanco es contexto dependiente, por ejemplo la metiltransferasa G9a es reclutada por Blimp1 en células

del osteosarcoma (204), pero no en células germinales (205). Más allá del contexto, los co-represores reclutados por Blimp1 tienen el mismo efecto neto de inducir una conformación cerrada de la cromatina del locus blanco, previniendo la transcripción. Blimp1 fue primeramente descrito por el laboratorio de Tom Maniatis en 1991 como una proteína que se une al promotor de interferón beta (IFN- $\beta$ ) y reprime su expresión (206), luego el laboratorio de Merk Davis identificó la misma proteína como inductora de la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas (207).



**Figura 4. Mecanismos de represión génica mediados por Blimp1-** (A) Los genes blanco de Blimp1 antes de la unión de este represor están activos transcripcionalmente como se indica por la acetilación de la cola de las histonas y la conformación abierta de la cromatina. (B) Blimp1 interacciona físicamente con co-represores como groucho, deacetilasas de histonas (HDACS) y metiltransferasas de histonas (G9a y Prmt5) para reclutarlas al promotor del gen blanco. (C) La interacción de Blimp1 con los co-represores resulta en la modificación de las histonas incluyendo la metilación y deacetilación de las colas de las histonas. (D) En conjunto, los cambios de las histonas promueven la conformación cerrada de la cromatina previniendo la transcripción del gen.

Las funciones inmunes relacionadas con Blimp1 han sido extensivamente caracterizadas. Este represor posee un importante rol en la regulación de la diferenciación funcional de linfocitos B y T (207, 208) y ha sido también implicado en la función mieloide (209). En células B es requerido para la diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos (207). Sin embargo la actividad de Blimp1 no es esencial para la iniciación de la secreción de inmunoglobulinas por los pre-plasmoblastos (precursores de células plasmáticas maduras) si para que los pre-plasmoblastos completen su diferenciación en células plasmáticas maduras que secretan altas cantidades de anticuerpos (210). La maduración de los linfocitos B correlaciona con la habilidad de Blimp1 de reprimir un gran número de genes críticos para la maduración hacia la identidad y proliferación celular (211-214).

En las células T, Blimp1 es inducido luego de activación y es expresado en las poblaciones efectoras y de memoria. Ratones deficientes en Blimp1 presentan un número incrementado de células T periféricas con fenotipos efectoras y de memoria, indicando que Blimp1 regula la homeostasis de estas poblaciones (208). Ha sido demostrado que la vía de señalización de IL-2 induce la expresión de Blimp1 en las células T (215-217) lo cual lleva a inhibición de la producción de IL-2 a través de la unión directa al promotor de IL-2 así como también a través de la inhibición de la expresión de c-Fos, miembro de la familia AP-1 (216). La supresión de la producción de IL-2 atenuaría la proliferación de las células T y es necesario para promover la apoptosis y por lo tanto regular la respuesta inmune de este tipo celular. Más aún, ha sido demostrado que Blimp1 es mayormente expresado en células T CD4<sup>+</sup> del linaje Th2, posiblemente reprimiendo la expresión de los genes que codifican para el factor de transcripción T-bet e IFN- $\gamma$  (característicos del linaje Th1) (218).

## **Blimp1 - Tle4 e IFN- $\gamma$**

En las células T CD4+ la transcripción de IFN- $\gamma$  es activada por la señalización del TCR (219, 220) y la subsecuente secreción de la misma inicia una retroalimentación positiva que produce más IFN- $\gamma$  a través de la vía R-IFN- $\gamma$ /STAT1. STAT1 activado induce la transcripción de *TBX21* que codifica el factor de transcripción T-bet el cual luego induce la transcripción de IFN- $\gamma$  e interfiere con la función de GATA-3 reforzando la producción de IFN- $\gamma$  y la polarización Th1 (221) (222) (223). *Cimino y colaboradores* (218), reportaron que la expresión del ARNm de IFN- $\gamma$  y de T-bet es mayor en ratones deficientes en Blimp1 respecto del salvaje, esto fue evidenciado cuando se utilizaron células T CD4+ tratadas bajo condiciones no polarizantes (CD3/CD28/IL-2) y re-estimuladas con PMA-ionomicina. Esta tipo de activación provoca un desvío de la estimulación vía TCR, demostrando que la regulación de Blimp1 ocurre río abajo de la activación de las PKC y de movilización del Ca<sup>+</sup>, sugiriendo que Blimp1 podría reprimir directamente la expresión de IFN- $\gamma$  y de T-bet. Fue demostrado además por estos autores que efectivamente Blimp1 se une a una región del gen de IFN- $\gamma$  conocida como CNS-22, se trata de una secuencia conservada que se encuentra a 22 kilobases río arriba del sitio de inicio de la transcripción. En las células Th1 la región CNS-22 posee la histona H3K4 metilada mientras que en las células se observa la H3K27 metilada (188). Esta secuencia además es esencial para la expresión de IFN- $\gamma$  en las células T CD4+, T CD8+ y NK (224). Blimp1 se une específicamente a la secuencia TTCACTTTCCT en CNS-22 con mayor afinidad, una secuencia que está altamente conservada también en humanos. TLE4 (Transducin-like enhancer of Split), es un miembro de la familia Groucho de co-represores transcripcionales, es una de las proteínas expresadas en las células T en respuesta a estímulo anérgico (225). TLE4 se oligomeriza, se asocia con el

dominio terminal de las proteínas modificadoras de histonas y puede formar estructuras de alto orden como parte de complejos represivos (226). Los co-represores de la familia Groucho interaccionan con el extremo N-terminal de las histonas y recluta complejos conteniendo HDACs de clase I para silenciamiento génico (227, 228).

TLE4 no posee dominio de unión al ADN (229) pero puede ser reclutado al sitio blanco por diferentes proteínas, tales como proteína con dominios Runt, proteínas de alta movilidad (HMG), y Blimp1, para inducir represión transcripcional de los genes blanco (227, 230, 231). Ha sido demostrado que TLE4 es reclutado a la región CNS-22 de *IFNG* durante el estímulo anérgico en células T de ratón (232). Durante este tipo de estímulo se activa el TCR sin señales co-estimuladoras, se incrementan los niveles de calcio intracelular, el cual activa calmodulina dependiente de la calcineurina fosfatasa, la calcineurina desfosforilada activa el factor nuclear de células T activadas (NFAT) el cual se transloca al núcleo (233, 234) . En contraste, a lo que ocurre en las células T activadas, en donde NFAT se une a la proteína activadora AP-1 para inducir la activación de genes inducidos, bajo estímulo anérgico se induce la activación de NFAT bajo actividad sub-óptima de AP-1. NFAT entonces activa genes que codifican proteínas responsables de bloquear la señalización del TCR e inhibir la IL-2 (235). También ha sido demostrado que este sitio CNS-22 además de reclutar a Tle4, recluta también HDAC1 y HDAC2, llevando a una fuerte tri-metilación de la H3K9 y decrecimiento en la acetilación de las H3 y H4. Así estos resultados sugieren que niveles elevados de TLE4 en las células T anérgicas podrían inducir modificaciones represivas en la cromatina contribuyendo a la disminución en la expresión de IFN- $\gamma$  en estas células. Como se mencionó anteriormente TLE4 no posee dominio de unión al ADN, interesantemente Blimp1 se une a la región CNS-22 de *IFNG* y a HDAC1 – HDAC2.

Más aún, fue demostrado que en las células T anérgicas, TLE4 es de hecho reclutado por Blimp1, provocando el silenciamiento génico (232). A diferencia de Blimp1 que está altamente expresado en células Th2, TLE4 es expresado de igual manera en Th1 y Th2.

***Teniendo en cuenta estos antecedentes en el presente trabajo se evaluaron los mecanismos genéticos y epigenéticos que podrían regular la producción de IFN- $\gamma$  en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* y que podrían mediar la susceptibilidad a la enfermedad.***



## Objetivos



## **Regulación genética de la producción de IFN- $\gamma$ y su asociación con la susceptibilidad a la Tuberculosis**

### **Objetivo general**

- Determinar si existe asociación de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) con la susceptibilidad a la tuberculosis y establecer un posible haplotipo como marca genética de riesgo a la enfermedad.

### **Objetivos específicos**

Para llevar a cabo el objetivo general, en el presente trabajo se propone evaluar SNPs presentes en genes claves en la respuesta inmune frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*:

- El SNP +874 A/T presente en el gen que codifica para IFN- $\gamma$ , citoquina clave en la generación de una respuesta inmune protectora frente a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*.
- Los SNPs -262 A/T; -188 A/G y +1343 G/T presentes en la región promotora y codificante del gen que codifica para SLAM, molécula linfocitaria activadora de señales que induce la producción de IFN- $\gamma$ .
- Los SNPs -631 A/T; -494 A/G y -346 C/T presentes en la región promotora del gen que codifica para SAP, proteína de unión a SLAM que regula negativamente la producción de IFN- $\gamma$ .

## **Regulación epigenética de la producción de IFN- $\gamma$ y su asociación con la susceptibilidad a la Tuberculosis**

### **Objetivo general**

- Determinar la influencia de factores epigenéticos en la regulación de la expresión de IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

### **Objetivos específicos**

- Investigar si el estado de metilación del sitio CpG -53 presente en la región promotora del gen que codifica para IFN- $\gamma$  podría mediar la regulación de esta citoquina en pacientes con tuberculosis.
- Determinar si el represor Blimp1 y el co-represor TLE4 regulan la expresión del gen *IFNG* en respuesta a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Evaluar si el mecanismo de represión podría involucrar el reclutamiento de enzimas deacetilasas de histonas.

## **Materiales y Métodos**



## **Individuos participantes del estudio**

En este trabajo participaron individuos con tuberculosis pulmonar activa (rango etario: 18-59 años) y dadores sanos (DS) vacunados con BCG. El diagnóstico de tuberculosis fue establecido acorde a los datos clínicos y radiológicos, conjuntamente con la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes presentes en esputo, mediante la coloración de Ziehl-Neelsen. Los pacientes incluidos en este estudio no presentaban otras patologías y al momento de la extracción de la muestra habían recibido menos de una semana de tratamiento con las drogas anti-tuberculosas. El diagnóstico de tuberculosis latente (TBL) se realizó utilizando el test de liberación de IFN- $\gamma$  Quantiferon TB Gold Test, siguiendo las instrucciones del fabricante (Cellestis Valencia, CA. USA).

Las muestras de sangre periférica se recolectaron en tubos heparinizados luego del consentimiento informado de cada participante.

## **Células y cultivos celulares**

Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con tuberculosis activa (PTB) e individuos con tuberculosis latente (TBL) y dadores sanos (DS). Las CMSP fueron aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (G.E. Healthcare) y cultivadas a una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/ml en placas de 48 y 96 pocillos (Greiner Bio-One). Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con penicilina/estreptomicina (Invitrogen), glutamina (2mM, Sigma-Aldrich) y 10 % de suero bovino fetal (SBF) (Gibco) o suero humano (SH) (Sigma); a 37°C y con 5 % de CO<sub>2</sub>.

## **Antígeno**

La estimulación *in vitro* de las CMSP a lo largo del estudio fue realizada con un sonificado de la cepa virulenta H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*, 10µg/ml; NIH Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Bethesda, MD, USA), lisado celular total NR-14822).

## **Genotipificación de Polimorfismos de nucleótido simple (SNP)**

### **Extracción de ADN**

El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre entera de pacientes con tuberculosis activa (PTB), individuos con tuberculosis latente (TBL) y dadores sanos (DS), siguiendo las instrucciones del fabricante (Quick-gDNA™ Blood MiniPrep, Zymo Research). Además se utilizó papel nucleico (Biodynamics) para la recolección de muestras de hisopado bucal de los cuales se extrajo ADN siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones.

### **SNP de IFN- $\gamma$ +874 A/T**

El SNP de IFN- $\gamma$  +874 A/T (rs2430561) fue determinado mediante la técnica de ARMS-PCR (del inglés, Amplification refractory mutation system-Polymerase chain reaction) descrita previamente (102). Para determinar los genotipos de este SNP fueron diseñados cebadores para amplificar un fragmento de 261 pb. Además, como control interno de reacción se utilizó un par de cebadores diseñados para amplificar 426 pb del gen que codifica para la hormona de crecimiento humana (HGH, del inglés human

growth hormone). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C 5 minutos; seguido de 10 ciclos de 95°C 30 segundos, 62°C 50 segundos, 72°C 1 minuto; luego 20 ciclos de 95°C 20 segundos, 56°C 50 segundos, 72°C 50 segundos y una elongación final a 72°C 5 minutos.

### **SNPs de SLAM -262 A/T, -188 A/G y +1343 G/T**

Los SNPs de la Molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM) -262 A/T (rs2295614) y -188 A/G (rs2295613) fueron genotipificados por la técnica de PCR-RFLP (del inglés, Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) descrita previamente (116).

Para el SNP -262 A/T fueron diseñados un par de cebadores para amplificar un fragmento de 262 pb, el cual fue incubado por 1 hora y 30 minutos a 37°C para lograr la digestión con la enzima de restricción HinfI (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de la digestión y según el genotipo presente se observó: 262 pb (TT), 230 pb /32 pb (AA) y 262 pb/ 230 pb/ 32 pb (AT).

Un amplicón de 763 pb fue obtenido a partir de la amplificación de un par de cebadores diseñados para el SNP -188 A/G. La genotipificación del mismo fue lograda mediante el uso de la enzima de restricción HhaI (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El tiempo de incubación fue el mismo que se utilizó para la enzima de restricción HinfI pero se adicionó 15 minutos a 65 °C para la inactivación de HhaI. Los productos de digestión del amplicón de 763 pb según el genotipo fueron: 763pb (AA), 567pb /196pb (GG) y 763pb / 567pb /196pb (AG). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos; seguido de 35 ciclos

de 96°C 45 segundos, 56°C o 56,5°C 45 segundos, 72°C 1 minuto, elongación final 72°C 10 minutos.

Para confirmar los resultados obtenidos por PCR-RFLP muestras de individuos con los diferentes genotipos para los SNPs -262 y -188 de SLAM fueron secuenciadas (Macrogen, Korea).

El SNP de SLAM +1343 G/T (rs3796504) fue amplificado por PCR en un fragmento de 397 pb con cebadores diseñados específicamente utilizando el software Beacon Designer. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos; seguido de 35 ciclos de 95°C 1 minuto, 48°C 1 minuto, 72°C 1 minuto y elongación final a 72°C 7 minutos. Los productos de PCR fueron purificados con el Kit DNA Clean & Concentration™-25(Zymo Research), según las instrucciones del fabricante para finalmente determinar los genotipos mediante secuenciación estándar (Macrogen, Korea). Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa Chromas Lite (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

### **SNPs de SAP -631 A/G; -494 A/G y -346 C/T**

Los tres SNP de la Proteína de unión a SLAM (SAP) -631 A/G (rs990545); -494 A/G (rs7357894) y -346 C/T (rs12164382) fueron amplificados por PCR en un fragmento de 650 pb, utilizando para ello cebadores específicos diseñados con el software Beacon Designer. Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 95°C 10 minutos; seguido de 35 ciclos a 95°C 1 minuto, 56°C 1 minuto, 72°C 1 minuto y elongación final a 72°C 7 minutos. Los productos de PCR fueron purificados con el Kit DNA Clean & Concentration™-25(Zymo Research), según las instrucciones del fabricante para finalmente determinar los genotipos mediante secuenciación estándar



(Macrogen, Korea). Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa Chromas Lite (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

La mezcla de reacción para la amplificación en todos los casos fue: aproximadamente 200 ng de ADN genómico total, Taq polimerasa (1 unidad, GoTaq DNA Pol-Promega), buffer de la enzima (1X, Promega), dNTPs (0,8 Mm, Inbio Highway), cebadores (0,5  $\mu$ M o 5  $\mu$ M, IDT-Biodynamics) y agua estéril libre de ADNasas para alcanzar un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (Bioer Gene Pro).

Todos los productos de amplificación y de digestión por enzimas de restricción fueron corridos en geles de agarosa al 2% teñidos con el colorante Sybr Safe (Invitrogen) y visualizados con un transiluminador UV. Se utilizó el buffer TBE 1X (Tris-Ácido bórico-EDTA) tanto para la preparación del gel de agarosa como para la corrida electroforética.

Los cebadores de ADN utilizados fueron los siguientes:

Cebadores de ADN	Secuencias
IFN- $\gamma$ +874 A/T Fw A	5' - TTCTTACAACAAAAATCAAATCA - 3'
IFN- $\gamma$ +874 A/T Fw T	5' - TTCTTACAACACAAAATCAAATCT- 3'
IFN- $\gamma$ +874 A/T Rv	5' -TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA- 3'
HGH Fw	5' -GCCTTCCAACCATTCCTTA- 3'
HGH Rv	5' -TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC- 3'
SLAM -262 A/T Fw	5' -TCATCGGGGTACAGGGTTTCTTC- 3'
SLAM -262 A/T Rv	5' -TAAAAATATCTGAGCAGTTCTCTCCGGTGAG- 3'
SLAM -188 A/G Fw	5' -TGAAATAAACAGAAGTAAGAGGT C- 3'
SLAM -188 A/G Rv	5' -GAGTGACCAACACAATACCC- 3'
SLAM -1343 G/T Fw	5' -GGAGTTGATCTGAGAAG- 3'
SLAM -1343 G/T Rv	5' -ATGCTTATGCTTGAAGG- 3'
SAP SNPs Fw	5' -AACAGATTTTATGGACAAAAT- 3'
SAP SNPs Rv	5' -ACAGGGGAGGAACATTGGAA- 3'

## Retro-transcripción y PCR en tiempo real

Para la cuantificación de la expresión del ARN mensajero de GAPDH (Gliceraldehido-3-fosfato Deshidrogenasa), SAP, IFN- $\gamma$ , Blimp1 y TLE4, se realizó la transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real. Así, las CMSP de pacientes con tuberculosis activa y dadores sanos estimuladas en presencia o ausencia del antígeno de *M. tuberculosis* por distintos tiempos, fueron obtenidas y lavadas con PBS mediante centrifugación. Seguidamente, las células fueron lisadas en TRIzol® siguiendo las instrucciones del fabricante (Ambion, Life Technologies). Los lisados fueron

almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de la extracción del ARN total. Para esto, los lisados celulares fueron mezclados con cloroformo y centrifugados (15 minutos a 12000 rpm). La fase acuosa conteniendo el ARN fue transferida a un nuevo tubo y el ácido nucleico fue precipitado con isopropanol (10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , seguido de agitación vigorosa), centrifugando nuevamente 15 minutos a 12000 rpm. El ARN extraído fue lavado con etanol al 75% (centrifugando 5 minutos a 7500 rpm), secado a temperatura ambiente y posteriormente resuspendido en agua estéril, libre de ARNasas y ADNasas. La concentración de ARN fue determinada a 260 y 280nm. La pureza del ARN fue determinada a 260 y 280nm considerando una relación de  $A_{260}/A_{280} > 1.8$  como aceptable.

A partir de 250 ng de ARNm se realizó la transcripción reversa para la obtención del ADN complementario (ADNc). Brevemente, las muestras de ARNm fueron incubadas a  $60^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos y luego se realizó la reacción de transcripción inversa utilizando para ello: enzima de retrotranscripción M-MLV RT (100 unidades, Promega), buffer de reacción 1X, dNTPs (0,5 pmoles, GenBiotech), oligo dT (50 pmoles, GenBiotech), inhibidor de ARNasas (RNAsin 15 unidades, GenBiotech) en un volumen de reacción final de 20  $\mu\text{l}$ . La mezcla de reacción se incubó en un termociclador (Bioer Gene Pro) 1 hora a  $42^{\circ}\text{C}$  y luego 10 minutos a  $90^{\circ}\text{C}$ . El ADNc se utilizó como molde para la amplificación de los genes de interés, así como para la amplificación del gen normalizador codificante para GAPDH, mediante PCR en tiempo real.

Para la amplificación se utilizó la mezcla real *FastStart SYBR Green Master 2X* (Roche Applied Science) que contiene Taq polimerasa, dNTPs,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y SYBR Green. Se adicionaron los cebadores específicos (50 picomoles/reacción) y el ADNc molde. El

volumen final de la reacción utilizado fue de 25  $\mu$ l. La PCR en tiempo real se realizó en un termociclador de tiempo real (Bioer Line Gene 9600).

La expresión de los genes de interés fue calculada con el método comparativo de cuantificación relativa luego de la normalización con respecto a la expresión de GAPDH de la siguiente manera: Tasa de incremento =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = [Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen normalizador}}]$  y  $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{\text{condición estímulo}} - \Delta Ct_{\text{condición sin estimular}}]$ .

Los cebadores de ARNm utilizados fueron los siguientes:

Cebadores de ARNm	Secuencias
GAPDH Fw	5' -TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA G- 3'
GAPDH Rv	5' -TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT- 3'
SAP Fw	5' -AAATCAGCAGGGAAA CCG- 3'
SAP Rv	5' -CTCAGCACTCCAAGAACC- 3'
IFN- $\gamma$ Fw	5' -TGGGTTCTCTTGGCTGTTACTG- 3'
IFN- $\gamma$ Rv	5' - GAGTTCCATTATCCGCTACATCTG- 3'
Blimp1 Fw	5' - TACATACCAAAGGGCACACG- 3'
Blimp1 Rv	5' - TGAAGCTCCCCTCTGGAATA- 3'
TLE4 Fw	5' - TACCCCTACTCCACGAACT- 3'
TLE4 Rv	5' - TCTCCGTTTCATTCCAGCA- 3'

## **Metilación del sitio CpG -53 de IFN- $\gamma$**

El estado de metilación del sitio CpG -53 de IFN- $\gamma$  se realizó sobre muestras de ADN extraído a partir de sangre entera de pacientes con tuberculosis activa, individuos con tuberculosis latente y dadores sanos. Se procedió a la conversión del mismo con bisulfito de sodio siguiendo las instrucciones de los fabricantes (EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit, Zymo Research) y posterior PCR-bisulfito para los cuales se utilizaron cebadores diseñados con el programa Methyl Primer Express (Fw 5' -TAAGGAGTTTAAAGGAAATTTTAATTATA- 3', Rv (biotinilado) 5' -ATCTTTCTCTTCTAATAACTAATCTTCAA-3'). La mezcla de reacción de la PCR-bisulfito consistió en: 500 ng de ADN convertido con bisulfito de sodio, enzima Taq polimerasa (4 unidades, Go Taq Hot Start Polymerase-Promega), buffer de la enzima (1X, Promega), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM, Promega), dNTPs (200  $\mu$ M), cebadores (0,5  $\mu$ M, IDT-Biodynamics) y agua estéril libre de ADNasas en cantidad necesaria para alcanzar 50  $\mu$ l de volumen final de reacción. Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial 94°C 3 minutos; seguido de 40 ciclos de 94°C 30 segundos, 48°C 30 segundos, 72°C 1 minuto y elongación final a 72°C 10 minutos. El porcentaje de metilación del sitio CpG -53 de IFN- $\gamma$  fue determinado por Pirosecuenciación (Servicio del Instituto de genética Veterinaria – UNLP), utilizando para ello un cebador interno Fw: 5'-TTAAAAAATTTGTGA-3'.

## **ELISA**

En diferentes experimentos, los sobrenadantes de cultivo de las CMSP fueron obtenidos para evaluar la producción de citoquinas por ELISA. La producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA de captura en los sobrenadantes de cultivo libre de células siguiendo las instrucciones del fabricante (Human IFN- $\gamma$  ELISA MAX™ Standard, Biolegend).

## **Ensayos con inhibidores de deacetilasas (iHDACs)**

Se utilizaron tres inhibidores de deacetilasas (Enzo Life Sciences, gentilmente cedidos por el Dr. Norberto Zwirner). Tricostatina A (TSA): 0,1 uM; 0,5 uM; 1uM y 2uM, Butirato de sodio (NaB): 0,25mM; 0,5mM; 1mM; 2mM; 5mM y 10mM y Entinostat (MS275): 0,5uM; 1uM; 2,5uM; 5uM. La producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA a partir del sobrenadante de CMSP de dadores sanos estimuladas durante 48 horas con un sonicado de *M. tuberculosis* y tratadas con los tres iHDACs.

## **Ensayos de Apoptosis celular**

Las CMSP fueron estimuladas con el sonicado de *M. tuberculosis* en presencia/ausencia de las distintas concentraciones de iHDACs durante 48 horas. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1X y se determinó la apoptosis celular mediante la marcación con Anexina V-FITC (Immunotools) e Ioduro de Propidio (IP, Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las muestras fueron analizadas en un Citómetro de Flujo FACS Canto (BD Biosciences) y el análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo (v 5.7.2).

El criterio de análisis utilizado fue el siguiente:

**Análisis:**

	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>IP</b>	<b>C</b>	<b>D</b>

**Anexina V FITC**

**Cuadrantes:**

- A) AnexinaV/IP<sup>+</sup>: **Necrosis.**
- B) Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>: **Apoptosis tardía.**
- C) AnexinaV/IP<sup>-</sup>: **Población viable.**
- D) Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>: **Apoptosis temprana.**

La muerte celular se calculó como el porcentaje de pérdida celular =  $(1 - [\text{número de células viables (tratadas) / número de células viables (no tratadas)}]) \times 100$ .

**Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el software GraphPad Prism 5. La comparación de las frecuencias genotípicas se realizó mediante el test de Chi-cuadrado  $\chi^2$ . Se evaluó el equilibrio Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas observadas y esperadas. La asociación de los genotipos con la susceptibilidad a la infección fue determinada utilizando el estadístico OR (del inglés, odds ratio). El test de Wilcoxon fue utilizado para el análisis de muestras pareadas y el test de Mann-Whitney para muestras no pareadas. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## Resultados





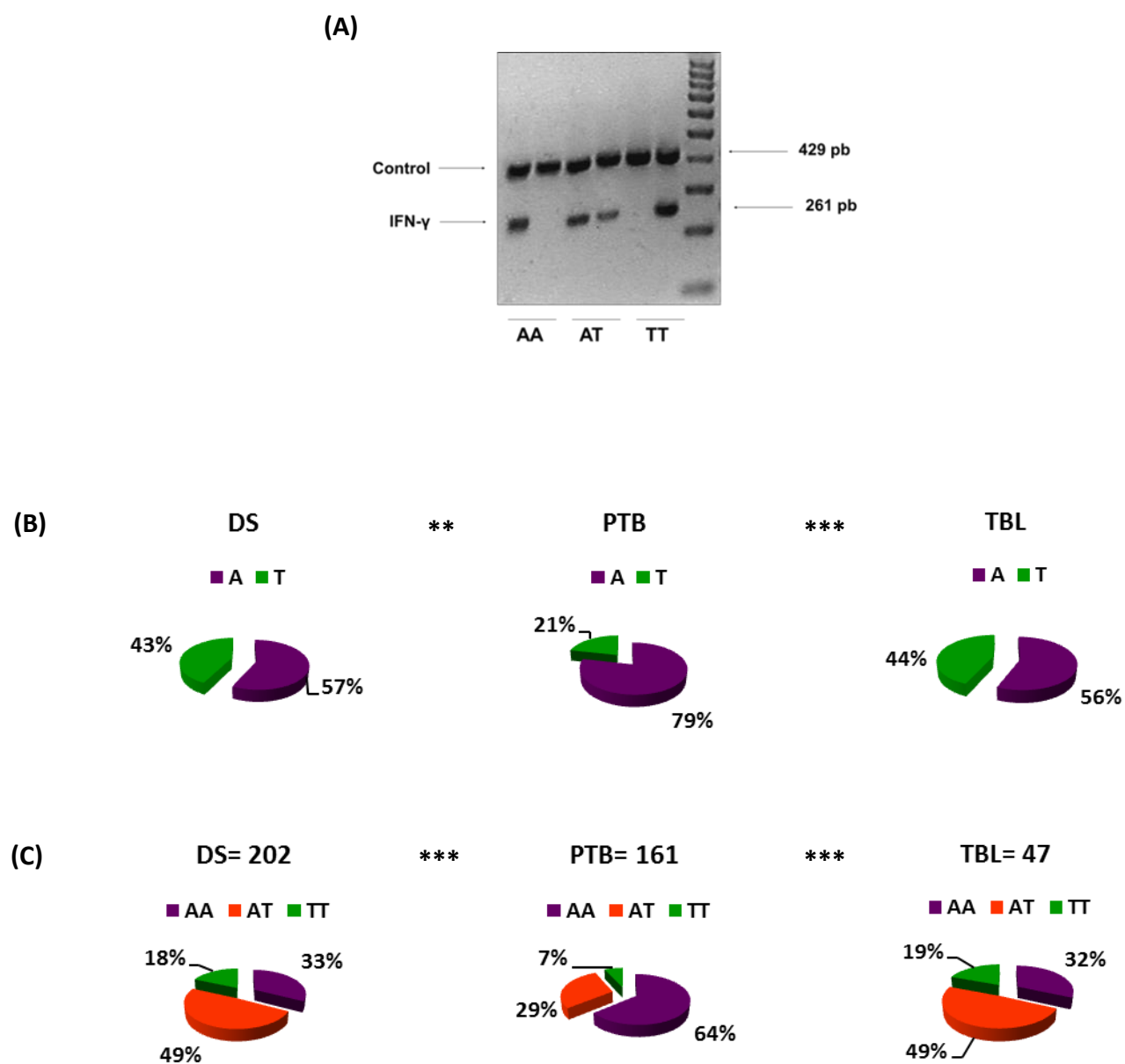
## **Determinación de SNPs- búsqueda de un haplotipo de susceptibilidad a la tuberculosis**

### **Determinación del SNP de IFN- $\gamma$ +874 A/T**

El SNP de IFN- $\gamma$  +874 A/T fue reportado por primera vez por *Pravica y colaboradores* en el año 2000 (102) está ubicado en la posición +874 respecto del sitio de inicio de la transcripción del gen que codifica el IFN- $\gamma$ . Los autores reportaron que este SNP se encuentra en el extremo 5' de una región microsatélite CA. El rol funcional de este polimorfismo puede deberse a que se halla en un sitio putativo de unión del factor de transcripción NF $\kappa$ B, por lo que la presencia del alelo A o T podría afectar la secuencia de reconocimiento y consecuentemente la tasa de transcripción génica. Ha sido ampliamente reportado en varias poblaciones alrededor del mundo, que el alelo A y más aún el genotipo AA está asociado a baja expresión de IFN- $\gamma$  y a susceptibilidad a la Tuberculosis (91, 103, 104, 106, 107, 236-238). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes del mismo en Argentina. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, decidimos estudiarlo en nuestra población, como parte de la búsqueda de marcadores genéticos de susceptibilidad a la Tuberculosis.

A partir de ADN genómico de sangre entera y muestras de hisopado bucal en papel nucleico, se genotipificaron un total de 410 individuos (PTB= 161; DS= 202 y TBL= 47) utilizando para ello, la técnica de ARMS-PCR (**Fig. 1A**). Nuestros resultados demostraron que el alelo A estuvo sobrerrepresentado en el grupo de pacientes (PTB: 79%; DS: 57% y TBL: 56%), con diferencias significativas en la distribución de

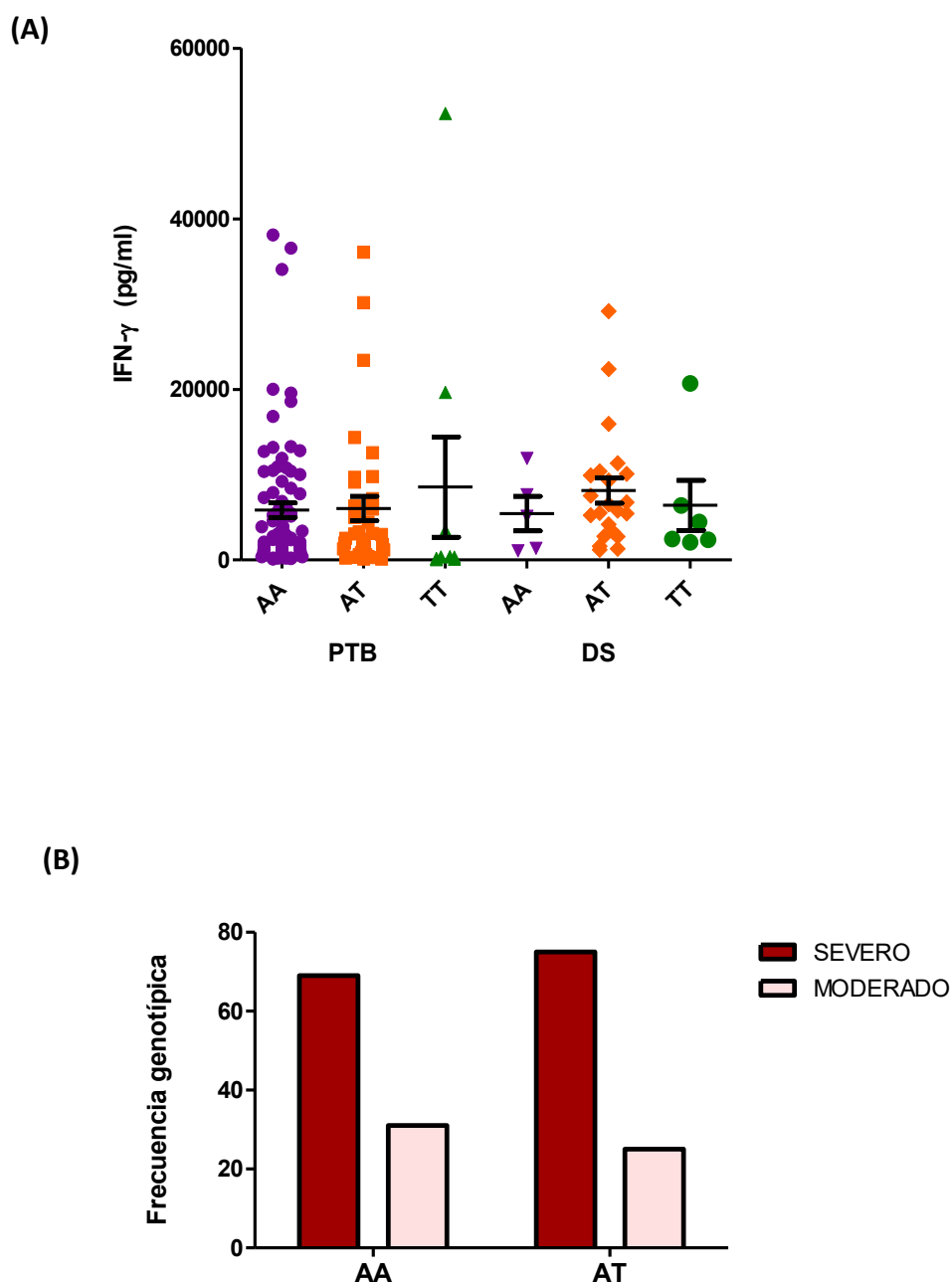
frecuencias alélicas (PTB vs DS  $p= 0,014$ ; TB vs TBL  $p= 0,0008$ ) excepto cuando se comparó DS vs TBL. \*,  $p < 0,05$  Test de Fisher (**Fig. 1B**). Debido a la elevada frecuencia del alelo A en PTB, el genotipo AA asociado a la susceptibilidad en otras poblaciones, resultó el más frecuente en ese grupo (PTB: 64%; DS: 33% y TBL: 32%), mientras que el genotipo heterocigota AT fue el más frecuente en DS y TBL (DS: 49%; TBL: 49% y PTB: 29%). Las diferencias fueron ampliamente significativas en la distribución de frecuencias genotípicas entre grupos (PTB vs DS  $\chi^2= 19,88$   $p < 0,0001$ ; TB vs TBL  $\chi^2= 21,33$   $p < 0,0001$ ) excepto, al igual que las frecuencias alélicas, cuando se comparó DS vs TBL. \*,  $p < 0,05$  Test de Chi-cuadrado (**Fig. 1C**). Los tres grupos evaluados estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg, con valores no significativos de Chi-cuadrado para las frecuencias genotípicas observadas y esperadas para este SNP. El cociente de probabilidades relativas OR de AA vs AT fue de 3,277 (IC 95% 1,758-6,107) y para AA vs TT de 4,987 (IC 95% 1,892-13,14). Así, estos resultados demuestran que los individuos con el genotipo AA tienen 4,987 veces más de probabilidad de desarrollar tuberculosis que los individuos TT.



**Figura 1.** El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL). El SNP +874 A/T de IFN- $\gamma$  fue determinado por ARMS-PCR. (A) Se muestra un ejemplo representativo (B) Distribución de frecuencias de los distintos alelos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Fisher. (C) Distribución de frecuencias de los distintos genotipos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Chi-cuadrado.

Por otro lado, evaluamos las posibles consecuencias funcionales de la presencia de uno u otro alelo de este SNP +874 A/T en la producción de IFN- $\gamma$ . Para ello, se determinó por ELISA la producción de esta citoquina en CMSP de pacientes con tuberculosis activa y dadores sanos estimuladas con un sonicado de la micobacteria durante 48 horas. Contrariamente a lo esperado, no se observaron diferencias significativas en la producción de IFN- $\gamma$  entre los 3 genotipos en los dos grupos evaluados (**Fig. 2A**). Más aún, se analizó la distribución de frecuencias de los tres genotipos de este SNP según la severidad de la presentación de la clínica de la enfermedad de acuerdo a las lesiones radiológicas: Moderado, pacientes con lesión unilateral involucrando dos o más lóbulos con cavidades y Severo, enfermedad con lesiones bilaterales con múltiples cavidades. Como se muestra en la **Figura 2B** se encontró que aquellos pacientes que poseen el genotipo AA o AT están distribuidos de igual modo en las formas moderada y severa de la enfermedad.

La elevada frecuencia del genotipo AA del SNP de IFN- $\gamma$  +874 A/T en el grupo de pacientes con tuberculosis activa sumado a los valores obtenidos del estadístico OR, sugieren que este podría ser un marcador de susceptibilidad a la enfermedad. Sin embargo, este SNP no estaría asociado con la severidad de la enfermedad.



**Figura 2. (A)** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB) y Dadores Sanos (DS) pertenecientes a los genotipos AA, AT y TT del SNP +874 A/T de IFN- $\gamma$  fueron estimuladas con un sonicado de *M. tuberculosis* por 48 horas y la producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA. **(B)** Distribución de los genotipos AA y AT de PTB en las dos presentaciones clínicas de la enfermedad según las lesiones radiológicas (severo o moderado).

## Estudio de los SNPs de SLAM -262 A/T; -188 A/G y +1343 G/T

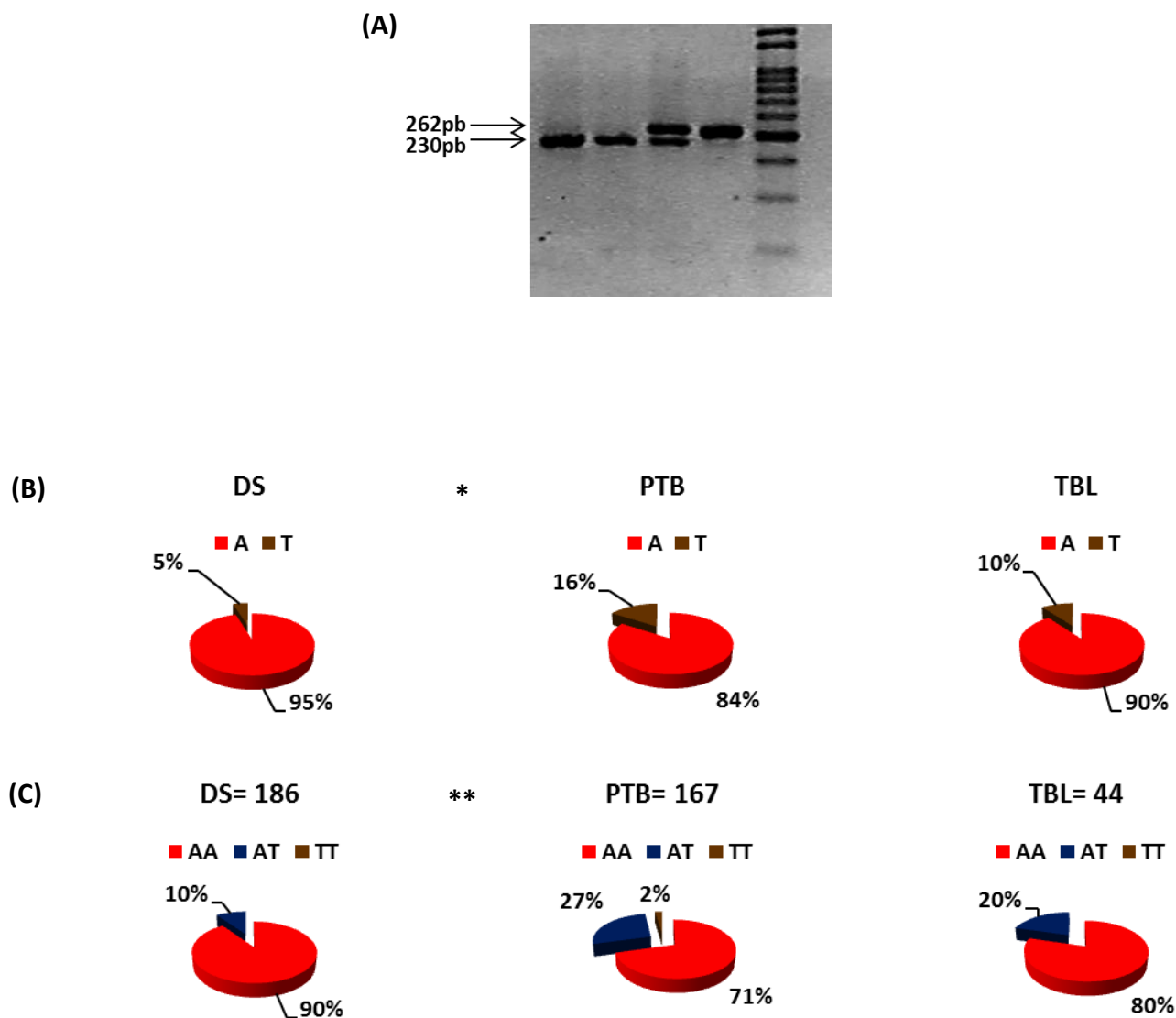
Nuestro grupo de trabajo ha demostrado previamente que la co-estimulación a través de la Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAM) induce la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección con *M. tuberculosis* (70). En búsqueda de marcas genéticas de susceptibilidad a la Tuberculosis y debido al rol importante que desempeña SLAM en la respuesta a esta infección, decidimos estudiar SNPs en la región promotora y en la región codificante del gen de SLAM y evaluar las posibles consecuencias funcionales de los mismos.

### SNPs de SLAM -262 A/T y -188 A/G

Los SNPs -262 A/T y -188 A/G se localizan en la región promotora del gen que codifica para SLAM, estos SNPs han sido estudiados por *You y colaboradores* en el año 2010, los cuales han encontrado asociación del haplotipo AA/GG (-262 A/T y -188 A/G) con bajos niveles de ARNm de SLAM en pacientes con lupus (116).

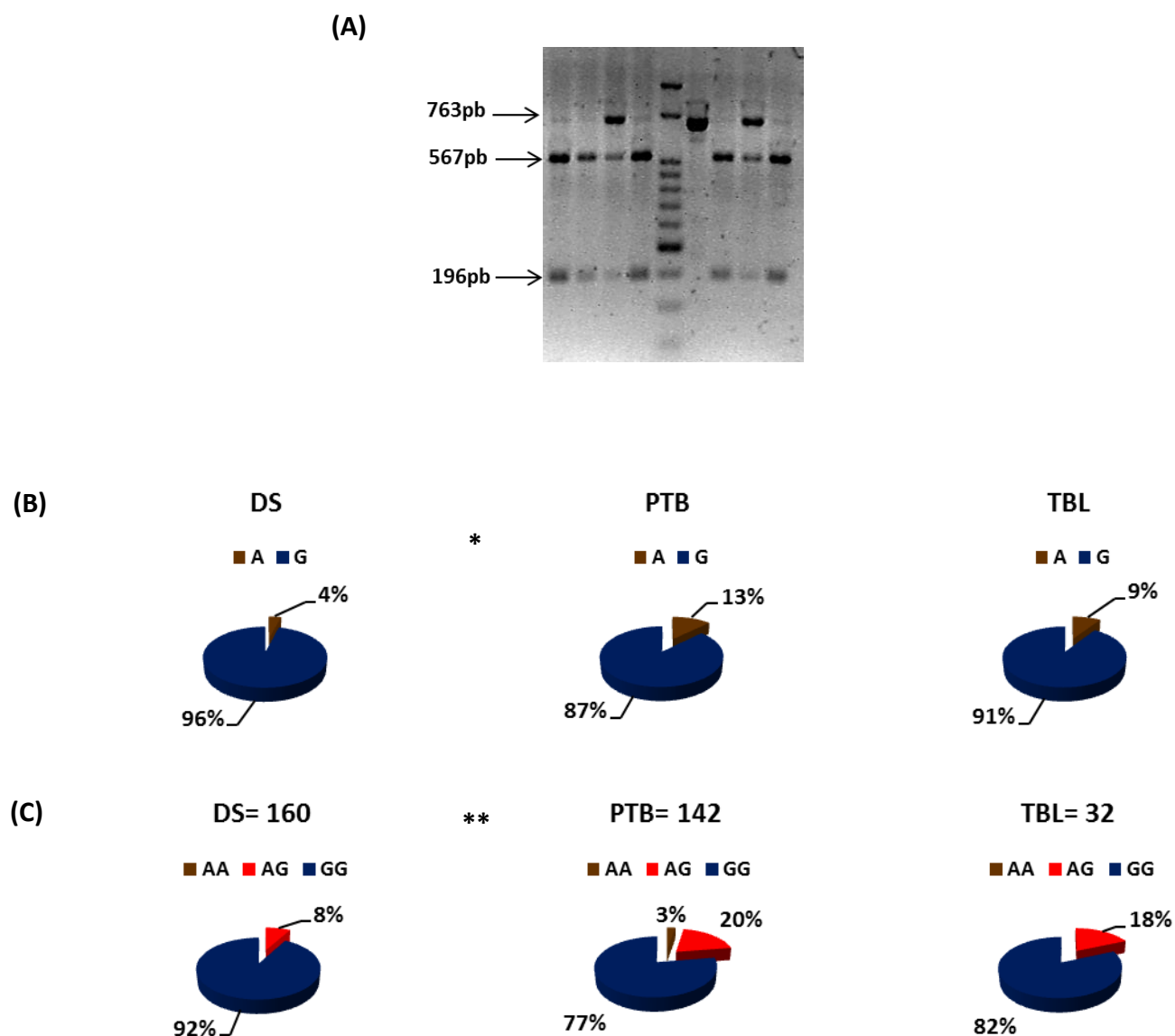
Empleando la técnica de PCR-RFLP y partiendo de ADN de sangre entera e hisopado bucal en papel nucleico, logramos genotipificar un total de 397 individuos para el SNP -262 A/T (PTB= 167; DS= 186 y TBL= 44) y 340 individuos para el SNP -188 A/G (PTB= 142; DS= 160 y TBL= 38) (**Fig. 3A y 4A**). Del análisis estadístico, hallamos que el alelo A y el genotipo AA del SNP -262 A/T estuvo sobrerrepresentado en los tres grupos en estudio (PTB A= 84%, AA= 71%; DS A= 95%, AA= 90% y TBL A= 90%, AA= 80%). Sin embargo, cuando se comparó las distribuciones de frecuencias entre PTB y DS existieron diferencias significativas tanto en la distribución de frecuencias alélicas ( $p= 0,0192$  \*,  $p < 0,05$  Test de Fisher) y frecuencias genotípicas ( $p= 0,0011$  \*,  $p < 0,05$  Test

de Fisher) (**Figs. 3B y 3C**). De modo similar, el alelo G y el genotipo GG del SNP -188 A/G fueron los más frecuentes en todos los grupos estudiados (PTB G= 87%, GG= 77%; DS G= 96%, GG= 92% y TBL G= 91%, GG= 82%). Al igual que para el SNP-262 A/T, existieron diferencias significativas en la distribución de frecuencias alélicas ( $p= 0,0398^*$ ,  $p < 0,05$  Test de Fisher) y genotípicas ( $X^2= 9,474$   $p= 0,0088^*$ ,  $p < 0,05$  Test de Chi-cuadrado) del SNP -188 A/G cuando se comparó PTB vs DS (**Figs. 4B y 4C**). Ambos SNPs de SLAM estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas observadas y esperadas. Los valores de OR en todos los casos fueron menores a 1 por lo que no se puede considerar asociación de estos SNPs con susceptibilidad a la Tuberculosis.



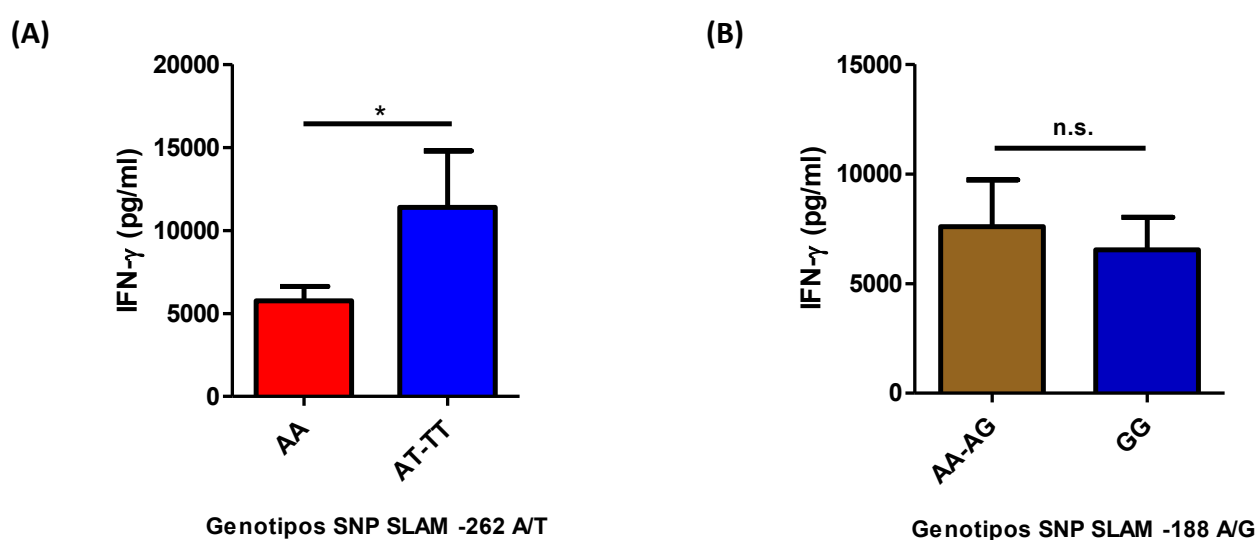
**Figura 3.** El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL). **(A)** El SNP -262 A/T de SLAM fue determinado por PCR-RFLP. **(B)** Distribución de frecuencias de los distintos alelos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Fisher. **(C)** Distribución de frecuencias de los distintos genotipos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Fisher.





**Figura 4.** El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL). **(A)** El SNP -188 A/G de SLAM fue determinado por PCR-RFLP. **(B)** Distribución de frecuencias de los distintos alelos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Fisher. **(C)** Distribución de frecuencias de los distintos genotipos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Fisher.

Para evaluar el posible impacto funcional de los SNPs de SLAM, se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  dentro de los diferentes genotipos. Interesantemente, los pacientes con el genotipo AA del SNP -262 A/T produjeron cantidades significativamente menores de IFN- $\gamma$ , cuando este fue determinado por ELISA a partir del sobrenadante de CMSP estimuladas con un sonicado de la micobacteria durante 48 horas ( $\bar{X}$  AA= 5751,75 pg/ml vs  $\bar{X}$  TT-AT = 11399,5 pg/ml;  $p= 0,0402$  \*,  $p < 0,05$ , Test de Mann-Whitney). Sin embargo no se observaron diferencias en la producción de IFN- $\gamma$  para el SNP de SLAM -188 A/G (Fig. 5).



**Figura 5.** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB) pertenecientes **(A)** a los genotipos AA vs. AT y TT del SNP -262 A/T de SLAM y **(B)** a los genotipos AA y AG vs GG del SNP -188 A/G de SLAM fueron estimuladas con un sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) por 48 horas y la producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA. \*,  $p < 0,05$ , Test de Mann Whitney.

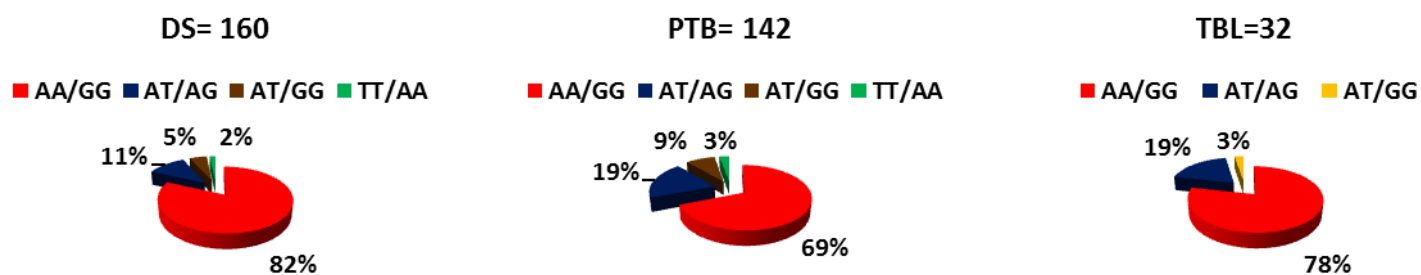
### Haplotipos de SLAM SNPs -262 A/T y -188 A/G

*You* y colaboradores (116) reportaron que los SNPs de SLAM -262 A/T y -188 A/G se hallan en desequilibrio de ligamiento (es decir no segregan de manera independiente) como consecuencia de su cercanía cromosómica. Esto se hizo evidente en nuestros resultados ya que estos dos SNPs demuestran una distribución similar de las frecuencias alélicas y genotípicas. En base a esto, determinamos la distribución de los haplotipos posibles de la combinación de los SNP SLAM -262 A/T y -188 A/G en los 3 grupos estudiados.

#### Haplotipos (SNP -262 A/T; -188 A/G)

AA	AA
AT	AA
TT	AA
AA	AG
AT	AG
TT	AG
AA	GG
AT	GG
TT	GG

De los nueve haplotipos posibles de la combinación de los SNPs de SLAM -262 A/T y -188 A/G, sólo cuatro de ellos fueron detectados en el grupo de pacientes e individuos control (AA/GG, AT/AG, AT/GG y TT/AA). Sin embargo el haplotipo AT/GG sólo fue hallado en el grupo de TBL junto con los haplotipos AA/GG y AT/AG, ya observados en los otros dos grupos. No existieron diferencias significativas en la distribución de los haplotipos entre los tres grupos en estudio (**Fig. 6**)



**Figura 6.** Distribución de haplotipos de los SNP de SLAM (-262 A/T; -188 A/G) en Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL).

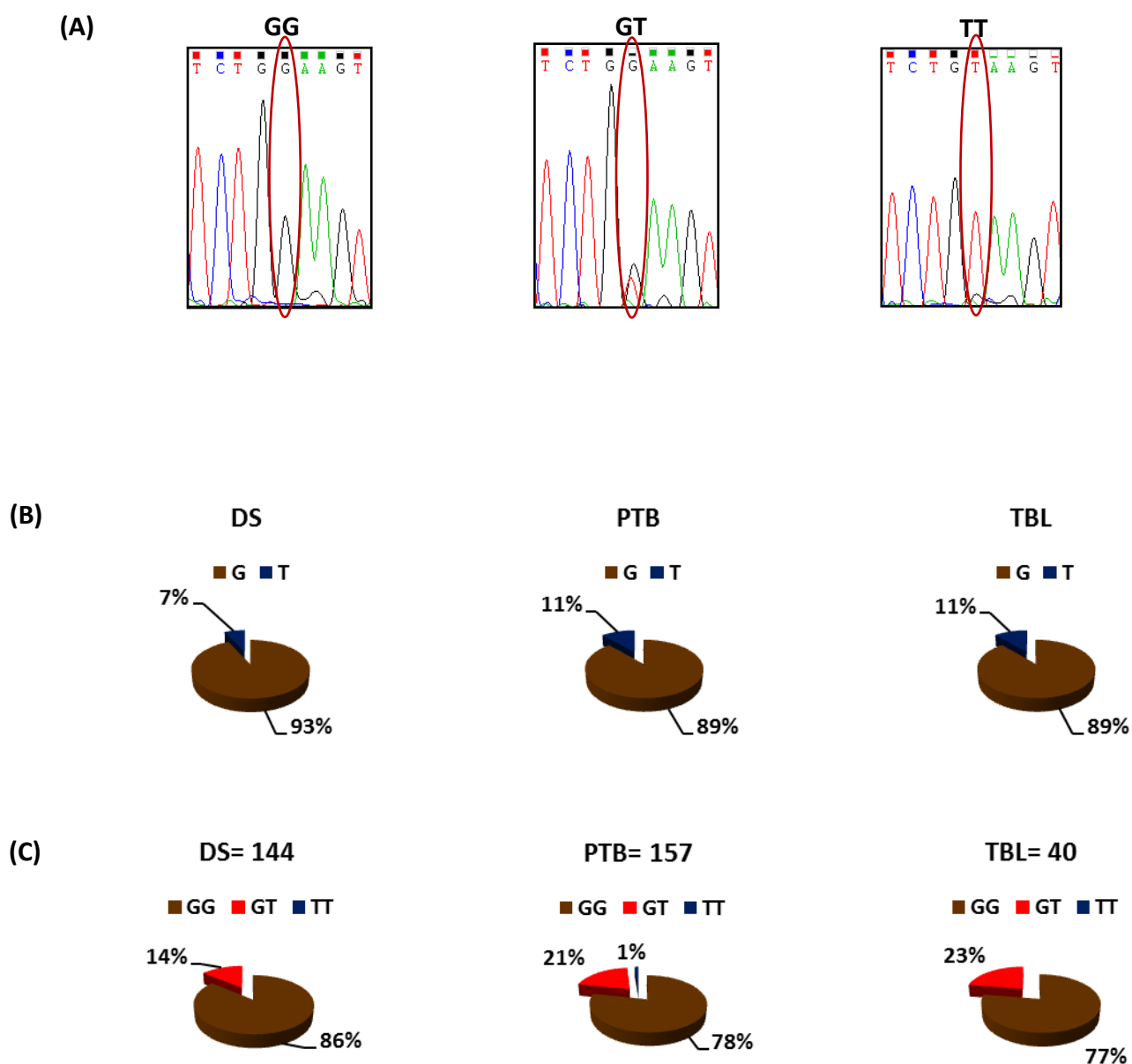
La elevada frecuencia del haplotipo AA/GG de los SNP de SLAM (SNP -262 A/T y -188 A/G) observado en los tres grupos no permiten considerarlos una marca genética de riesgo para el desarrollo de tuberculosis activa. Esto es validado por el estadístico OR que no superó el valor 1 en ningún caso, no existiendo asociación de estos SNP con la enfermedad.

## SNP de SLAM +1343 G/T

El SNP +1343 G/T de SLAM se ubica en la región codificante del gen y genera una mutación no sinónima. Debido a que SLAM actúa como receptor del virus del sarampión ha sido reportado que el alelo T se asocia a una menor producción de anticuerpos en respuesta a la infección con el virus (119). El SNP +1343 G/T de SLAM, al igual que los dos mencionados anteriormente, tampoco han sido estudiados hasta el momento en asociación con la tuberculosis.

Un total de 341 individuos (PTB= 157; DS= 144 y TBL= 40) fueron genotipificados por PCR y posterior secuenciación estándar a partir de muestras de ADN de sangre entera e hisopado bucal en papel nucleico (**Fig. 7A**). Del análisis de datos estadísticos para este SNP, encontramos que el alelo G fue el más frecuente en todos los grupos (PTB= 89%; DS= 93% y TBL= 89%) (**Fig. 7B**), al igual que el genotipo GG (PTB= 78%; DS= 86% y TBL= 77%) (**Fig. 7C**). En ningún caso existieron diferencias significativas en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas. Las frecuencias genotípicas observadas estuvieron en equilibrio de acuerdo a lo esperado según la Ley de Hardy-Weinberg.

El genotipo GG el SNP SLAM +1343 G/T esta sobrerrepresentado en todos los grupos en estudio por lo que no puede considerarse un posible marcador de susceptibilidad a la tuberculosis.



**Figura 7.** El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL). **(A)** El SNP +1343 G/T de SLAM fue determinado por PCR y posterior secuenciación. **(B)** Distribución de frecuencias de los distintos alelos. **(C)** Distribución de frecuencias de los distintos genotipos.

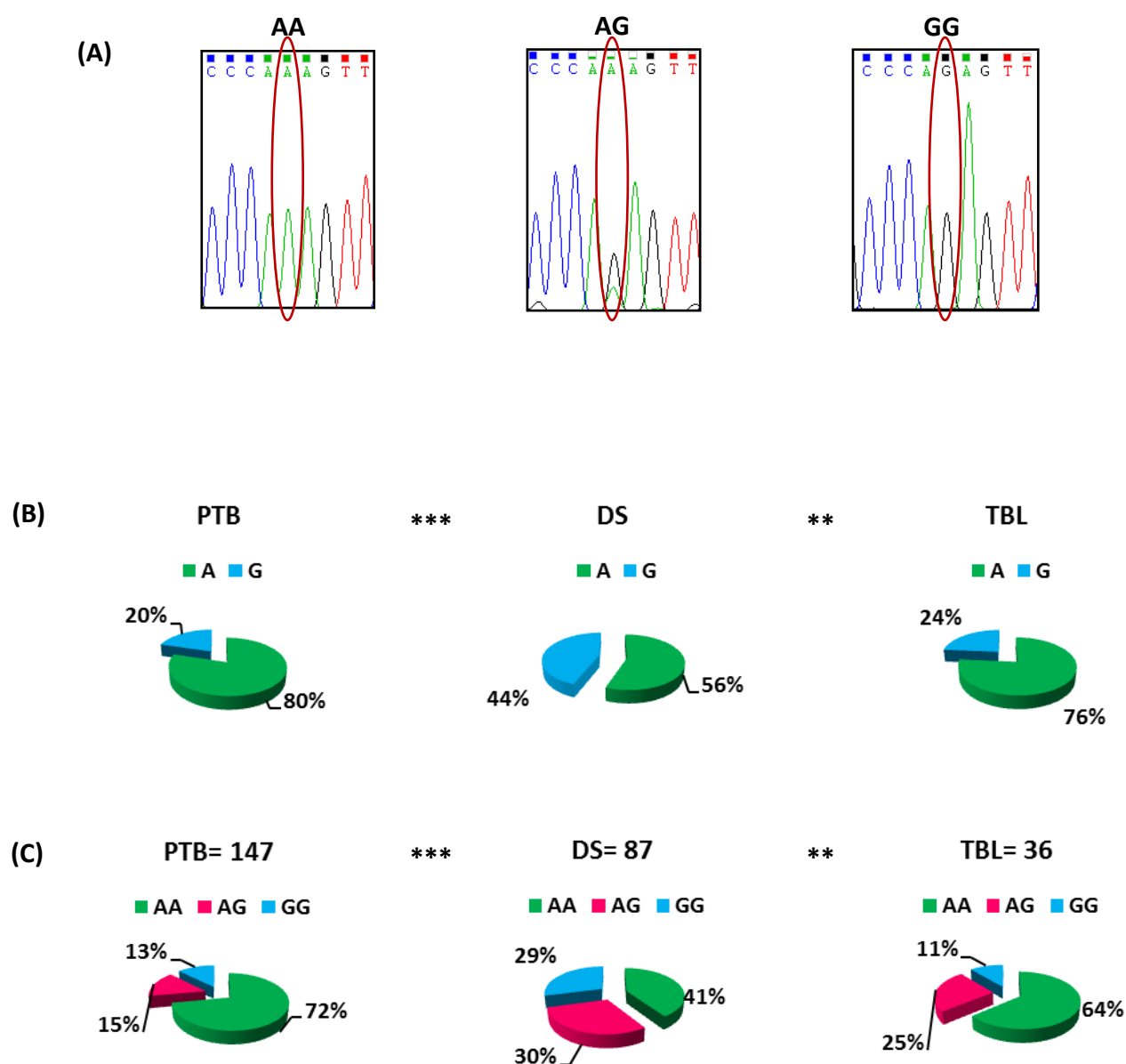
### SNPs de SAP -631 A/G, -494 A/G y -346 C/T

La proteína de unión a SLAM (SAP) envía una señal inhibitoria que resulta en la atenuación selectiva de la secreción de IFN- $\gamma$  (69). Debido a su rol como regulador negativo en la respuesta inmune a la tuberculosis, decidimos evaluar los SNPs de SAP -631 A/G, -494 A/G y -346 C/T, presentes en la región promotora de SAP. La citosina localizada en el SNP -346 C/T puede ser metilada e influir negativamente en la expresión génica de SAP. Se ha reportado que el alelo T del SNP -346 C/T se asocia con mayores niveles de ARNm de SAP y con susceptibilidad a enfermedades linfoproliferativas (239). Estos SNPs no han sido reportado en asociación con la tuberculosis.

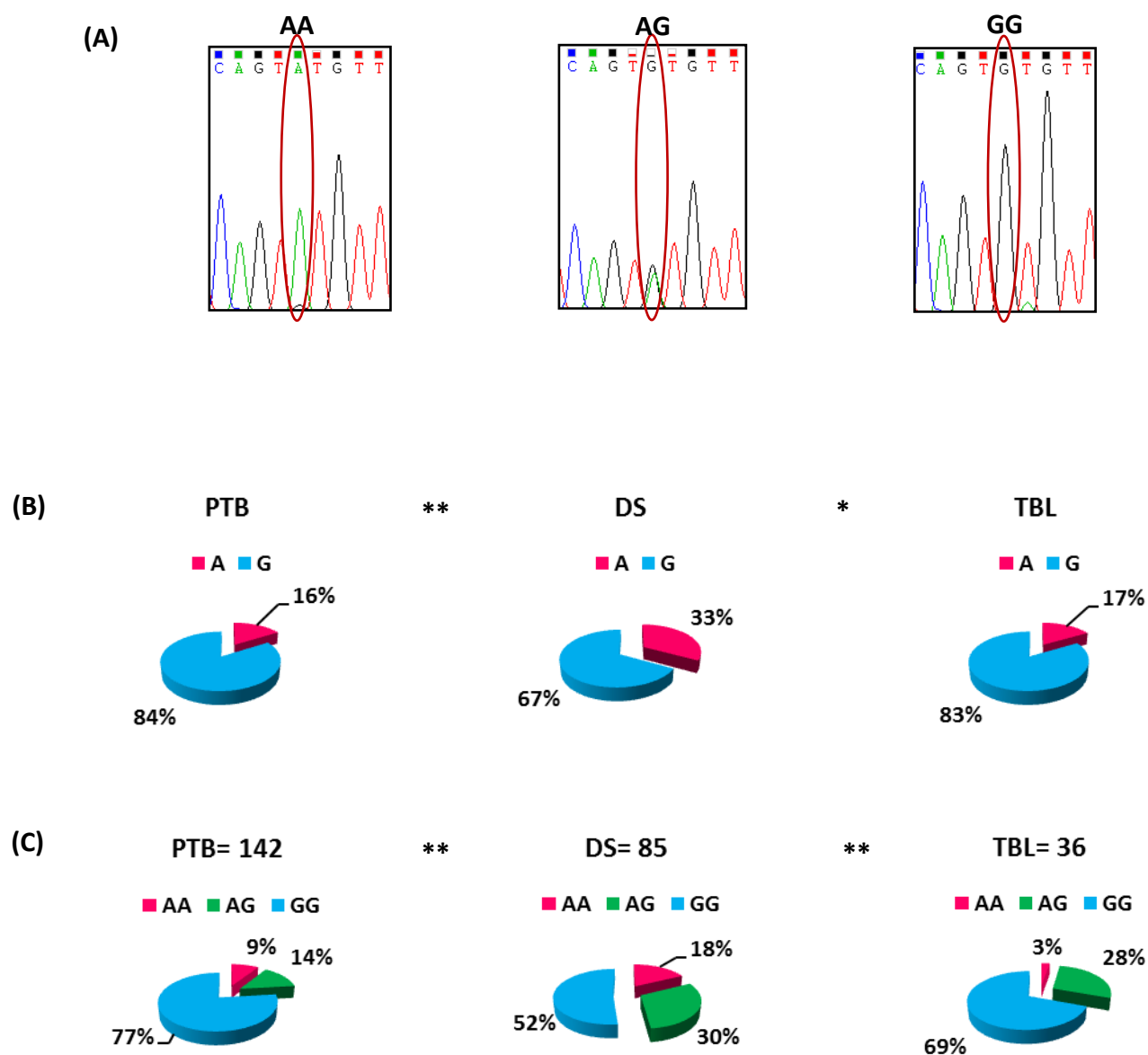
Mediante PCR y posterior secuenciación se genotificaron 269 individuos del SNP -631 A/G (PTB= 147; DS= 86 y TBL= 36), 263 individuos del SNP -494 A/G (PTB= 142; DS= 85 y TBL= 36) y 262 individuos del SNP -346 C/T (PTB= 141; DS= 85 y TBL= 36) (**Figs. 8-10A**). El alelo A y el genotipo AA del SNP -631 A/G fueron los más frecuentes en el grupo de pacientes (A= 80%; AA= 72%) comparados con los dadores sanos (A= 56%,  $p= 0,0004$  \*,  $p < 0,05$  Test de Fisher; AA= 41%,  $X^2= 19,60$   $p < 0,0001$  \*,  $p < 0,05$  Test de Chi-cuadrado) (**Fig. 8B y 8C**). Cuando se analizó el SNP -494 A/G, el alelo G así como el genotipo GG del SNP -494 A/G fueron los más frecuentes en PTB (G= 84%; GG= 77%) respecto del grupo control (G= 67%,  $p= 0,0081$  \*,  $p < 0,05$  Test de Fisher; GG= 52%,  $X^2= 13,66$   $p= 0,0011$  \*,  $p < 0,05$  Test de Chi-cuadrado) (**Fig. 9B y 9C**). Finalmente, el alelo T y el genotipo TT del SNP -346 C/T estuvieron sobrerrepresentados en pacientes con tuberculosis activa (T= 79%; TT= 71%), comparado con los DS (T= 55%,  $p= 0,0005$  \*,  $p < 0,05$  Test de Fisher; TT= 40%,  $X^2= 15,80$   $p= 0,0004$  \*,  $p < 0,05$  Test de Chi-cuadrado) (**Fig**

**10B y 10C).** No existieron diferencias significativas en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo de pacientes con tuberculosis activa e individuos con tuberculosis latente para los tres SNPs de SAP, excepto para las frecuencias genotípicas del SNP -494 A/G (PTB vs TBL  $X^2= 8,105$   $p= 0,0174$  \*,  $p < 0,05$  Test de Chi-cuadrado). Las frecuencias genotípicas de los 3 SNPs de SAP en pacientes y controles sanos no estuvieron en equilibrio de acuerdo a lo esperado según la Ley de Hardy-Weinberg; sin embargo sí lo estuvieron en el grupo de individuos con tuberculosis latente. Los valores de OR fueron: SNP -631 A/G AA vs AG= 3,512 (IC 95% 1,694-7,281) y AA vs GG= 3,917 (IC 95% 1,835-8,364), SNP -494 A/G GG vs AG= 3,173 (IC 95% 1,536-6,555) y GG vs AA= 2,962 (IC 95% 1,235-7,099), SNP -346 C/T TT vs CT= 2,108 (IC 95% 0,976-4,552) y TT vs CC= 4,233 (IC 95% 1,990-9,004).

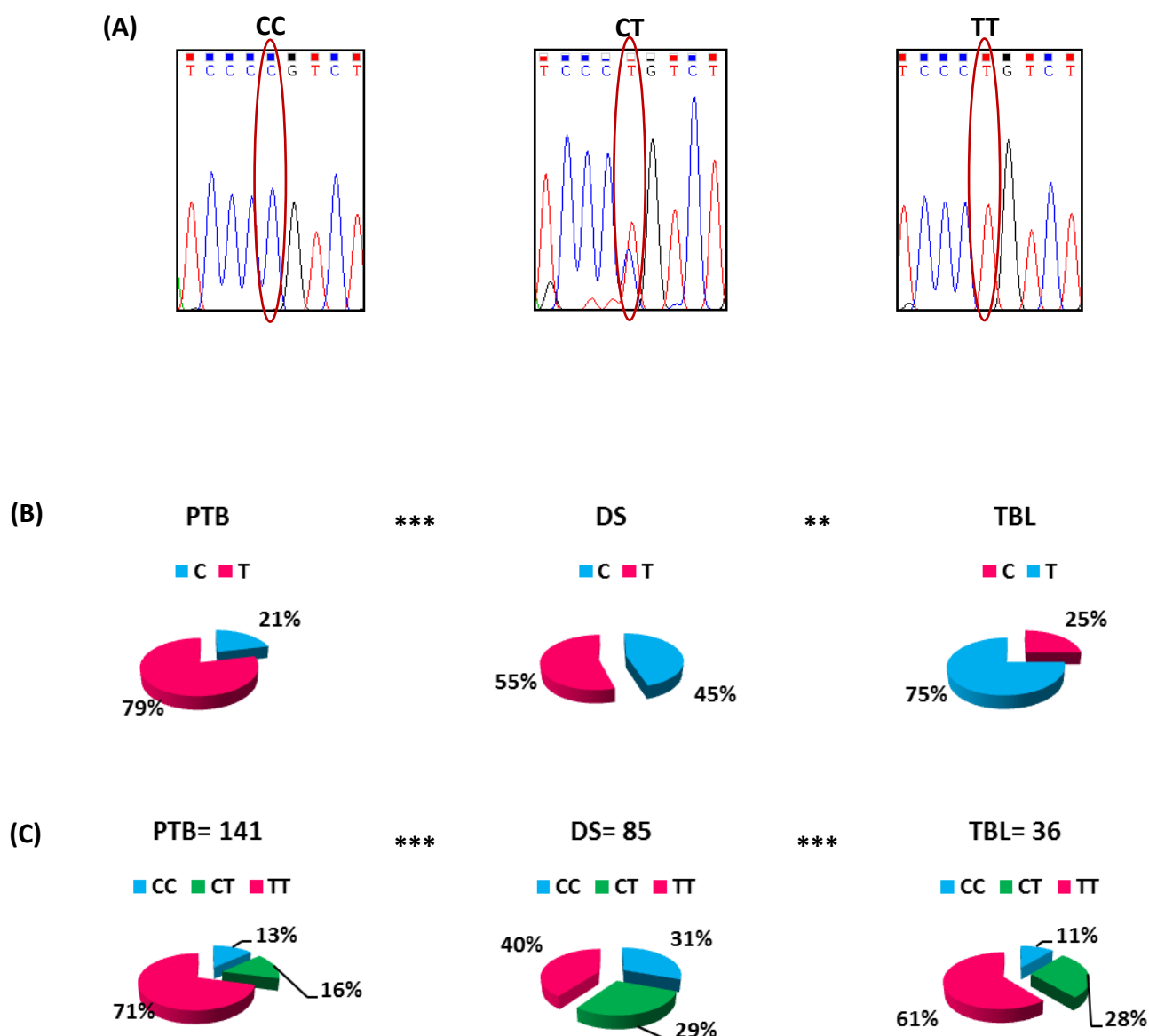




**Figura 8.** El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL). **(A)** El SNP -631 A/G de SAP fue determinado por PCR y posterior secuenciación. **(B)** Distribución de frecuencias de los distintos alelos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Fisher. **(C)** Distribución de frecuencias de los distintos genotipos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Chi-cuadrado.

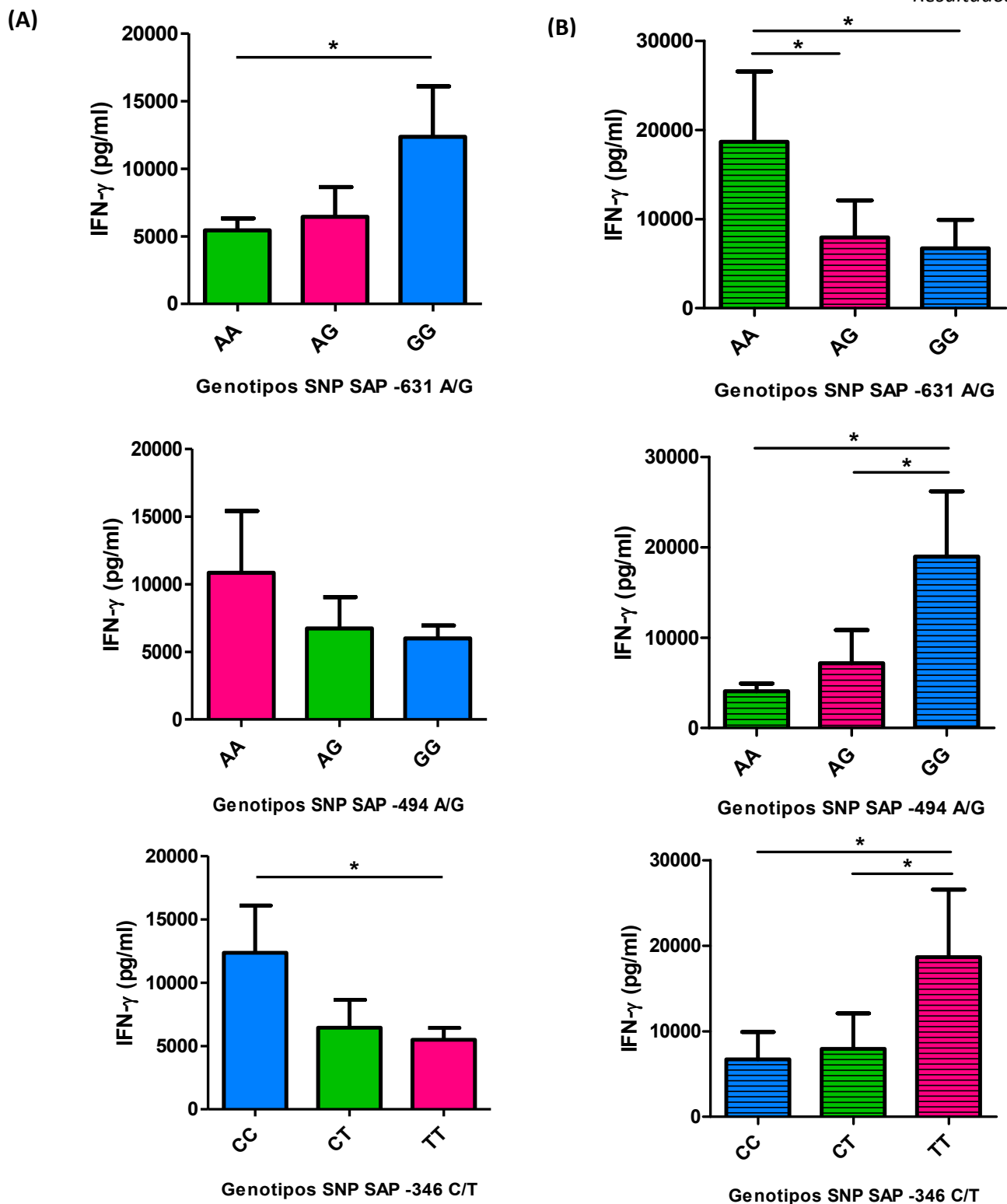


**Figura 9.** El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL). **(A)** El SNP -494 A/G de SAP fue determinado por PCR y posterior secuenciación. **(B)** Distribución de frecuencias de los distintos alelos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Fisher. **(C)** Distribución de frecuencias de los distintos genotipos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Chi-cuadrado.



**Figura 10.** El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL). **(A)** El SNP -346 C/T de SAP fue determinado por PCR y posterior secuenciación. **(B)** Distribución de frecuencias de los distintos alelos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Fisher. **(C)** Distribución de frecuencias de los distintos genotipos. \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Chi-cuadrado.

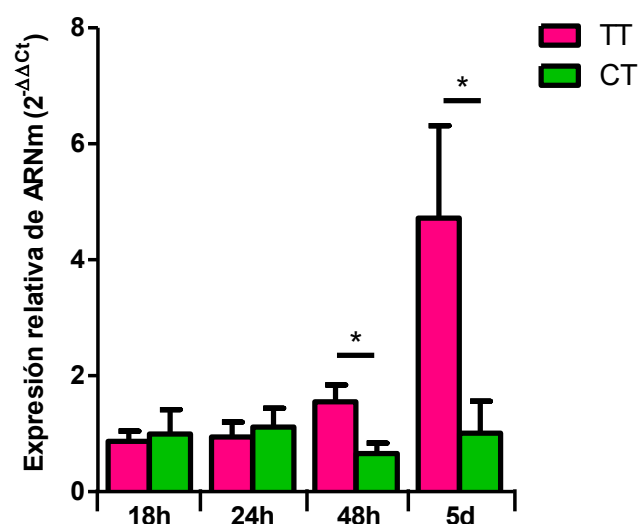
Como se mencionó anteriormente SAP se une a la cola citoplasmática de la molécula co-estimuladora SLAM e inhibe la vía de señalización que lleva a la expresión de IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*. Por lo que, nos propusimos evaluar si los SNPs de SAP influyen en la producción de IFN- $\gamma$ . Para lo cual, CMSP de pacientes con tuberculosis activa y dadores sanos pertenecientes a los distintos genotipos de los tres SNPs fueron estimuladas con un sonicado de *M.tuberculosis* durante 48 horas y la producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA. Se observó que los genotipos AA del SNP -631 A/G, GG del SNP -494 A/G y TT del SNP -346 C/T que han sido los más frecuentes en el grupo de pacientes, produjeron menor cantidad de IFN- $\gamma$  y esta diferencia fue significativa cuando se comparó con el genotipo homocigota menos frecuente, excepto para el SNP -494 A/G (\*,  $p < 0,05$  ANOVA) (**Fig. 11A**). Mientras que en los dadores sanos se observó un efecto completamente opuesto, es decir que los genotipos AA del SNP -631 A/G, GG del SNP -494 A/G y TT del SNP -346 C/T produjeron mayores niveles de la citoquina que aquellos individuos heterocigotas y homocigotas menos frecuentes (**Fig. 11B**).



**Figura 11.** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de (A) Pacientes con Tuberculosis activa (PTB) y (B) Dadores Sanos (DS) pertenecientes a los genotipos AA, AG, GG del SNP de SAP -631 A/G; -494 A/G y a los genotipos CC, CT, TT del SNP de SAP -346 C/T fueron estimuladas con un sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) por 48 horas y la producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA. \*,  $p < 0,05$ , ANOVA y post-test de Bonferroni para muestras no pareadas.

Los genotipos AA (SNP -631 A/G), GG (SNP -494 A/G) y TT (SNP -346 C/T) estuvieron sobrerrepresentados en el grupo de pacientes con tuberculosis activa, por lo que podrían ser marcas genéticas de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad. Específicamente el SNP de SAP -346 C/T fue el más asociado a la Tuberculosis por presentar el mayor valor del estadístico OR (TT vs CC= 4,233), es decir que los individuos con el genotipo CC tienen 4,233 veces más de probabilidad de desarrollar Tuberculosis que los individuos TT. Más aún, estos genotipos podrían influenciar el desarrollo de la enfermedad al asociarse con baja producción de IFN- $\gamma$ , citoquina clave para la respuesta inmune frente a la infección con *M.tuberculosis*.

Por otro lado, se analizó el posible efecto del SNP -346 C/T sobre la expresión del ARNm de SAP, ya que el alelo C es plausible de ser metilado y por lo tanto produciría represión génica. Para ello, CMSP de pacientes con tuberculosis activa fueron estimuladas con un sonocado de *M.tuberculosis* por distintos tiempos. De acuerdo a lo esperado, los resultados demostraron una mayor expresión de SAP en los pacientes con genotipo TT vs CT a las 48 horas ( $p= 0,0364^*$ ) y a los 5 días ( $p= 0,0317^*$ , test de Mann Whitney) (Fig. 12). En pacientes con tuberculosis activa el alelo T al no ser blanco de metilación, permitiría la expresión de SAP y disminuiría la producción de IFN- $\gamma$ .



**Figura 12.** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB) fueron estimuladas con un sonocado de *M. tuberculosis* por 18 horas, 24 horas, 48 horas y 5 días. La expresión de SAP fue determinada por PCR en tiempo real. Se utilizó el método comparativo de cuantificación relativa luego de la normalización son respecto a la expresión de GAPDH de la siguiente manera: Tasa de incremento =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = [Ct_{SAP} - Ct_{GAPDH}]$  y  $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{Mtb} - \Delta Ct_{Medio}]$ . \*,  $p < 0,05$ , ANOVA y post-test de Bonferroni para muestras no pareadas.

## Haplotipos de SAP

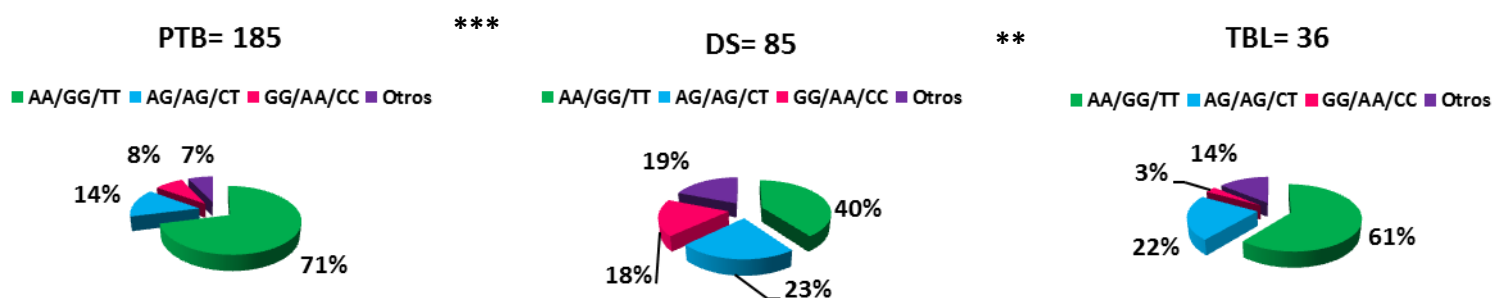
Dada la cercanía cromosómica de los tres SNPs de SAP y la distribución similar de las frecuencias alélicas y genotípicas observadas individualmente (lo cual indicaría desequilibrio de ligamiento), estos fueron analizados en grupos de haplotipos.

### Haplotipos (SNP SAP -631 A/G; -494 A/G y -346 C/T)

AA	AA	CC	AA	AA	CT	AA	AA	TT
AG	AA	CC	AG	AA	CT	AG	AA	TT
GG	AA	CC	GG	AA	CT	GG	AA	TT
AA	AG	CC	AA	AG	CT	AA	AG	TT
AG	AG	CC	AG	AG	CT	AG	AG	TT
GG	AG	CC	GG	AG	CT	GG	AG	TT
AA	GG	CC	AA	GG	CT	AA	GG	TT
AG	GG	CC	AG	GG	CT	AG	GG	TT
GG	GG	CC	GG	GG	CT	GG	GG	TT

Los haplotipos AA/GG/TT, AG/AG/CT, GG/AA/CC y otros (corresponde a los haplotipos restantes), fueron seleccionados de acuerdo a la frecuencia en que se presentaron en los tres grupos en estudio. El haplotipo AA/GG/TT fue el más frecuente en PTB: 71% y TBL: 61%, con un menor porcentaje en DS: 40%. Además se observó elevada diferencia significativa en la distribución de frecuencias haplotípicas entre PTB vs DS  $X^2= 20,23$   $p= 0,0002$  y TBL vs DS  $X^2= 15,86$   $p= 0,0012$  \*,  $p < 0,05$  Test de Chi-cuadrado. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon PTB vs TBL (**Fig. 13**).

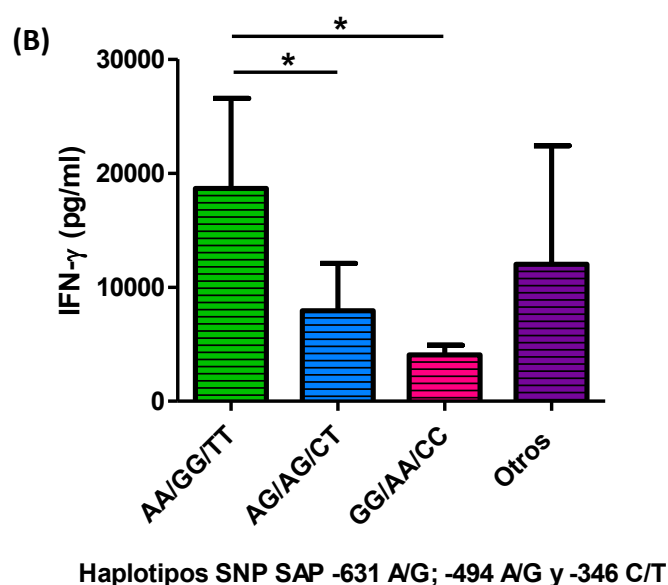
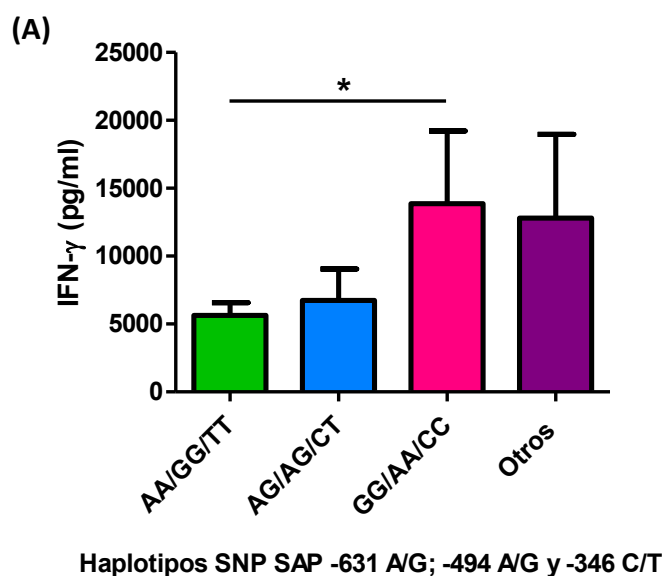




**Figura 13.** Distribución de haplotipos de los SNPs de SAP (-631 A/G; -494 A/G; -346 C/T) en Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL). \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Chi-cuadrado.

El OR de AA/GG/TT vs AG/AG/CT fue de 2,916 (IC 95% 1,351-6,294); AA/GG/TT vs GG/AA/CC 3,994 (IC 95% 1,594-10,01) y AA/GG/TT vs otros 4,818 (IC 95% 1,864-12,45). Sumado a esto, la producción de IFN- $\gamma$  fue significativamente menor en el haplotipo más frecuente en pacientes con tuberculosis activa (AA/GG/TT= 5634,97 pg/ml vs GG/AA/CC= 13854,20 pg/ml;  $p=0,031$  \*, test de Mann Whitney) (**Fig. 14A**). El efecto contrario, también fue observado en dadores sanos en los cuales el haplotipo AA/GG/TT produjo los niveles más altos de IFN- $\gamma$  (**Fig. 14B**).

Así los resultados demuestran que los genotipos AA (SNP -631 A/G), GG (SNP -494 A/G) y TT (SNP -346 C/T) de manera individual y de acuerdo a lo esperado, como haplotipo AA/GG/TT, podrían ser marcadores efectivos de susceptibilidad para el desarrollo de la Tuberculosis.



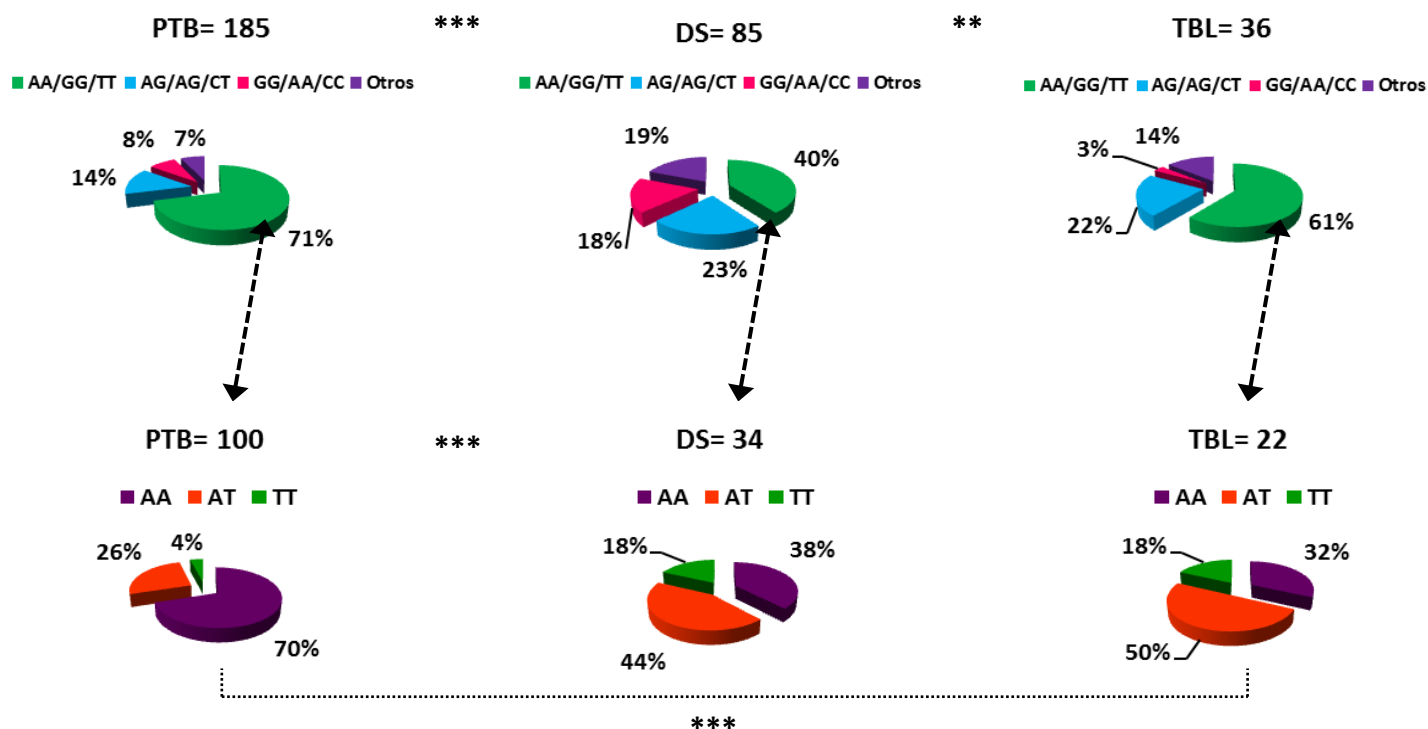
**Figura 14.** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de **(A)** Pacientes con Tuberculosis activa (PTB) y **(B)** Dadores Sanos (DS) pertenecientes a los distintos haplotipos de SAP (-631 A/G; -494 A/G y -346 C/T) fueron estimuladas con un sonicado de *M. tuberculosis* por 48 horas y la producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA. \*,  $p < 0,05$ , ANOVA y post-test de Bonferroni para muestras no pareadas.

## Haplotipo IFN- $\gamma$ /SAP de susceptibilidad a la Tuberculosis

Considerando que el genotipo AA del SNP +874 A/T de IFN- $\gamma$  y los genotipos AA/GG/TT de los SNPs de SAP -631 A/G, -494 A/G, -346 A/T podrían ser marcadores genéticos de susceptibilidad a la tuberculosis. Decidimos analizar la distribución del SNP de IFN- $\gamma$  +874 A/T dentro del haplotipo susceptible de SAP (AA/GG/TT). Encontramos que el 70% de los pacientes con tuberculosis activa además de portar el haplotipo de SAP AA/GG/TT poseen también la segunda marca de riesgo, el genotipo AA del SNP de IFN- $\gamma$  +874 A/T. Sin embargo, el genotipo AT del SNP de IFN- $\gamma$  +874 fue el más frecuente en DS y TBL (dentro del haplotipo AA/GG/TT de SAP) (**Fig. 15**).

Interesantemente, el estadístico OR del genotipo AA vs TT del SNP de IFN- $\gamma$  +874 A/T en combinación con el haplotipo susceptible de SAP (AA/GG/TT) fue de 7,941 (IC 95% 2,493-25,29), siendo 1,6 veces mayor al OR obtenido cuando se analizó el SNP +874 A/T individualmente (OR= 4,987 IC 95% 1,892-13,14). **Estos resultados indican que el haplotipo IFN- $\gamma$ /SAP AA-AA/GG/TT podría ser un haplotipo de susceptibilidad a la tuberculosis.** Más aún, cuando se comparó la distribución de frecuencias haplotípicas de SAP entre PTB y TBL no se observaron diferencias significativas siendo el haplotipo AA/GG/TT más frecuente en los dos grupos sin poder distinguir entre un marcador de latencia y de riesgo progresión a la enfermedad activa. Sin embargo, cuando se analizó la distribución de frecuencias genotípicas del SNP de IFN- $\gamma$  +874 A/T de PTB y TBL dentro del haplotipo de SAP AA/GG/TT, el genotipo AA fue el más frecuente en pacientes con Tuberculosis activa (70%) mientras que sólo se observó un 32% de individuos TBL con el genotipo AA ( $\chi^2= 30,64$   $p < 0,0001$  \*,  $p < 0,05$  Test de Chi-cuadrado). (**Fig.15**). Por lo que, la combinación haplotípica IFN- $\gamma$ -SAP AA-AA/GG/TT

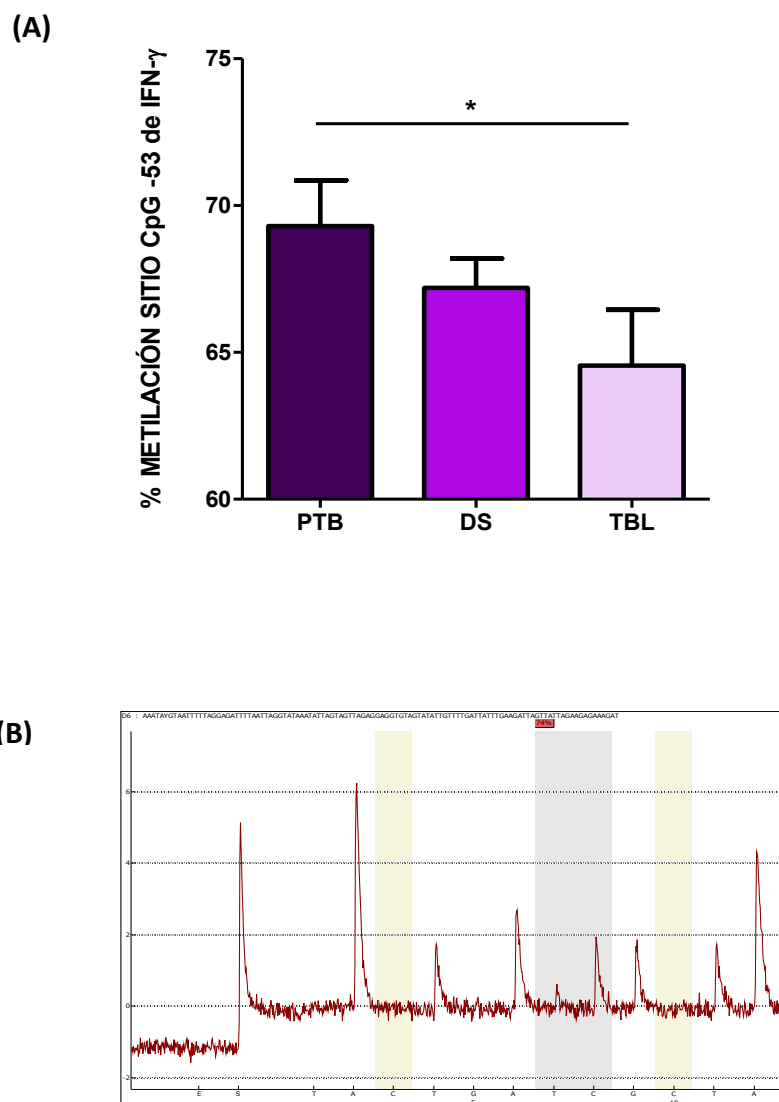
además podría ser considerado un marcador genético de riesgo a la progresión a la tuberculosis activa.



**Figura 15.** Distribución de frecuencias de los genotipos del SNP +874 A/T de IFN- $\gamma$  dentro del haplotipo susceptible de SAP AA/GG/TT (SNPs -631 A/G; -494 A/G y -346 C/T) en Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL). \*, Diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre los distintos grupos, Test de Chi-cuadrado.

## Metilación del sitio CpG-53 de la región promotora del de IFN- $\gamma$

Ha sido reportado previamente que la metilación *in vitro* del promotor de IFN- $\gamma$  reduce marcadamente la unión de distintos factores de transcripción, más específicamente el sitio CpG -53 resulta clave en la regulación transcripcional de este gen (194). Así, la hipermetilación del promotor del IFN- $\gamma$  podría ser otro mecanismo de regulación negativa de esta citoquina en los pacientes con tuberculosis; la cual podría involucrar una inhibición de la unión del factor de transcripción CREB (un regulador positivo de la producción del IFN- $\gamma$  (70, 240)). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en primera instancia, evaluamos el estado de metilación del sitio CpG -53 de la región promotora del gen que codifica para IFN- $\gamma$  en pacientes con tuberculosis activa, individuos con tuberculosis latente e individuos sanos. Para ello, se partió de muestras de sangre entera, se procedió a la extracción de ADN, conversión del mismo con el agente químico bisulfito de sodio, posterior PCR bisulfito y análisis del porcentaje de metilación por pirosecuenciación. Se observó un elevado porcentaje significativo de metilación del sitio CpG -53 de la región promotora del gen de IFN- $\gamma$  en el grupo de pacientes respecto del grupo de individuos con tuberculosis latente (PTB= 69,30% vs. TBL= 64,55%;  $p= 0,0182$  \*, test de Mann Whitney) (**Fig. 16A**). La elevada metilación observada en muestras de sangre de PTB sugiere una falla en la regulación epigenética de este sitio el cual debería demetilarse en condiciones de tuberculosis activa.

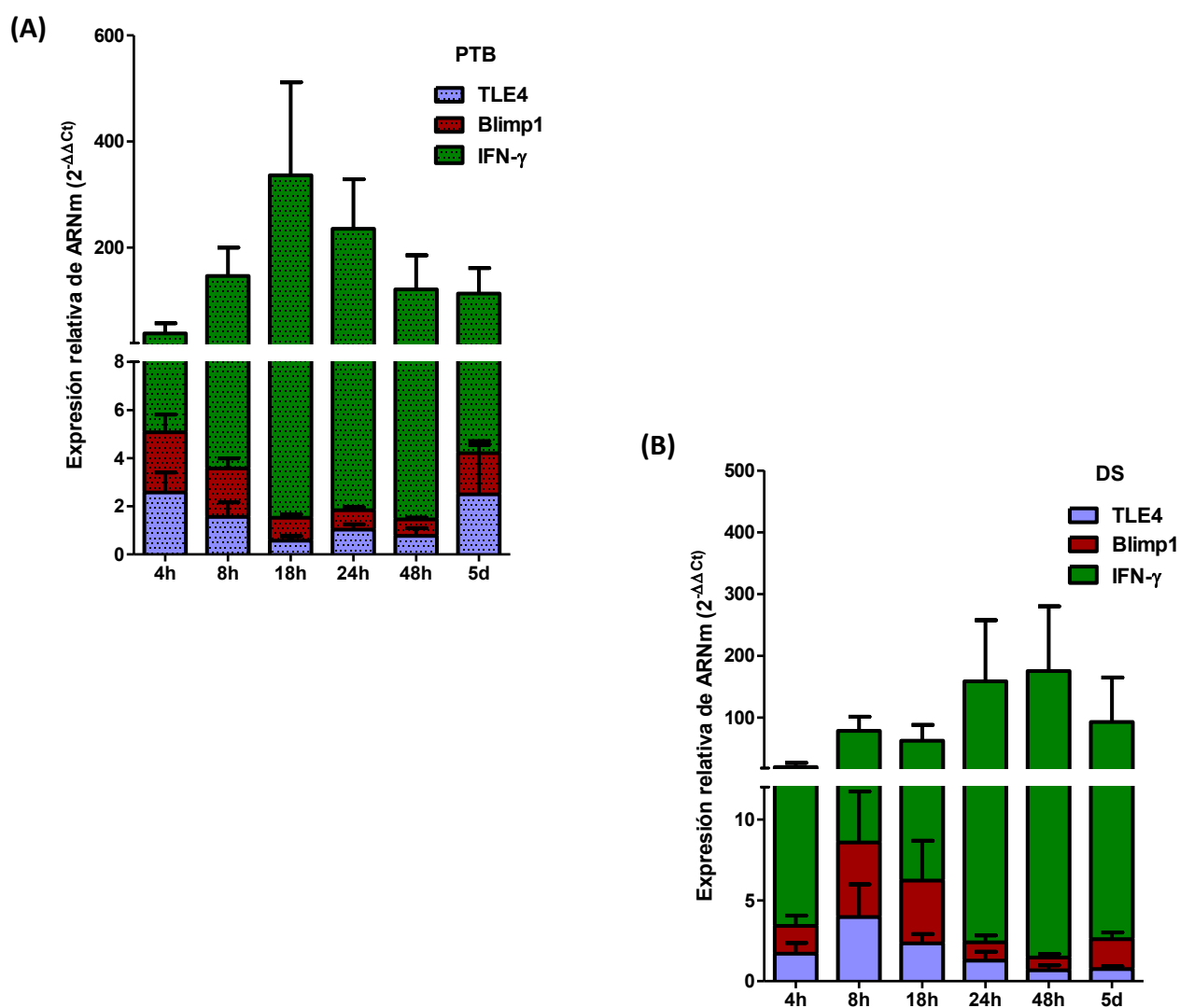


**Figura 16. (A)** El porcentaje de metilación del sitio CpG -53 del gen de IFN- $\gamma$  fue determinado por pirosecuenciación a partir de muestras de ADN de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB), Dadores Sanos (DS) e individuos con Tuberculosis Latente (TBL) tratadas con bisulfito de sodio y posterior PCR-Bisulfito. **(B)** Pirograma representativo.

## Expresión del represor Blimp1 y del co-represor TLE4

Otro aspecto de la regulación epigenética es la acetilación/deacetilación de proteínas histonas de unión al ADN, estas modificaciones químicas provocan activación o represión génica respectivamente, mediante el control del estado de compactación de la cromatina y por ende la permisividad de la unión de factores de transcripción a las secuencias génicas blanco. El represor Blimp1 atenúa la expresión de IFN- $\gamma$  en células Th2 durante la polarización Th1/Th2 (218). Blimp1 forma un complejo junto con el co-represor TLE4. Este complejo se une al promotor del gen de IFN- $\gamma$  y reprime su expresión en células T anérgicas (232). Para reprimir la expresión génica el complejo Blimp1/TLE4 recluta a la cromatina enzimas deacetilasas de histonas del tipo I y II (HDACs) y metiltransferasas de histonas del tipo H3K9Me y H2A/H4R3 2Me (241). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos determinar si el represor génico Blimp1 y el co-represor TLE4 eran diferencialmente regulados en respuesta a la estimulación con *M. tuberculosis*, lo cual podría entonces llevar a represión de la expresión de IFN- $\gamma$ .

Para ello, determinamos la expresión de ARNm del represor Blimp1 y del co-represor TLE4, y su asociación con la expresión de IFN- $\gamma$ . Los resultados demostraron que tanto en pacientes con tuberculosis como en dadores sanos, la estimulación con *M. tuberculosis* induce incrementos significativos de la expresión tanto de Blimp1 como de TLE4 (**Fig. 17**). Interesantemente, se observó tanto en PTB como en DS, una cinética de expresión inversa de los represores con respecto al IFN- $\gamma$ . Es decir, los mayores niveles de expresión de IFN- $\gamma$  se observaron en aquellos tiempos donde se detectaron los niveles más bajos de ambos represores Blimp1 y TLE4 (**Fig. 17**).

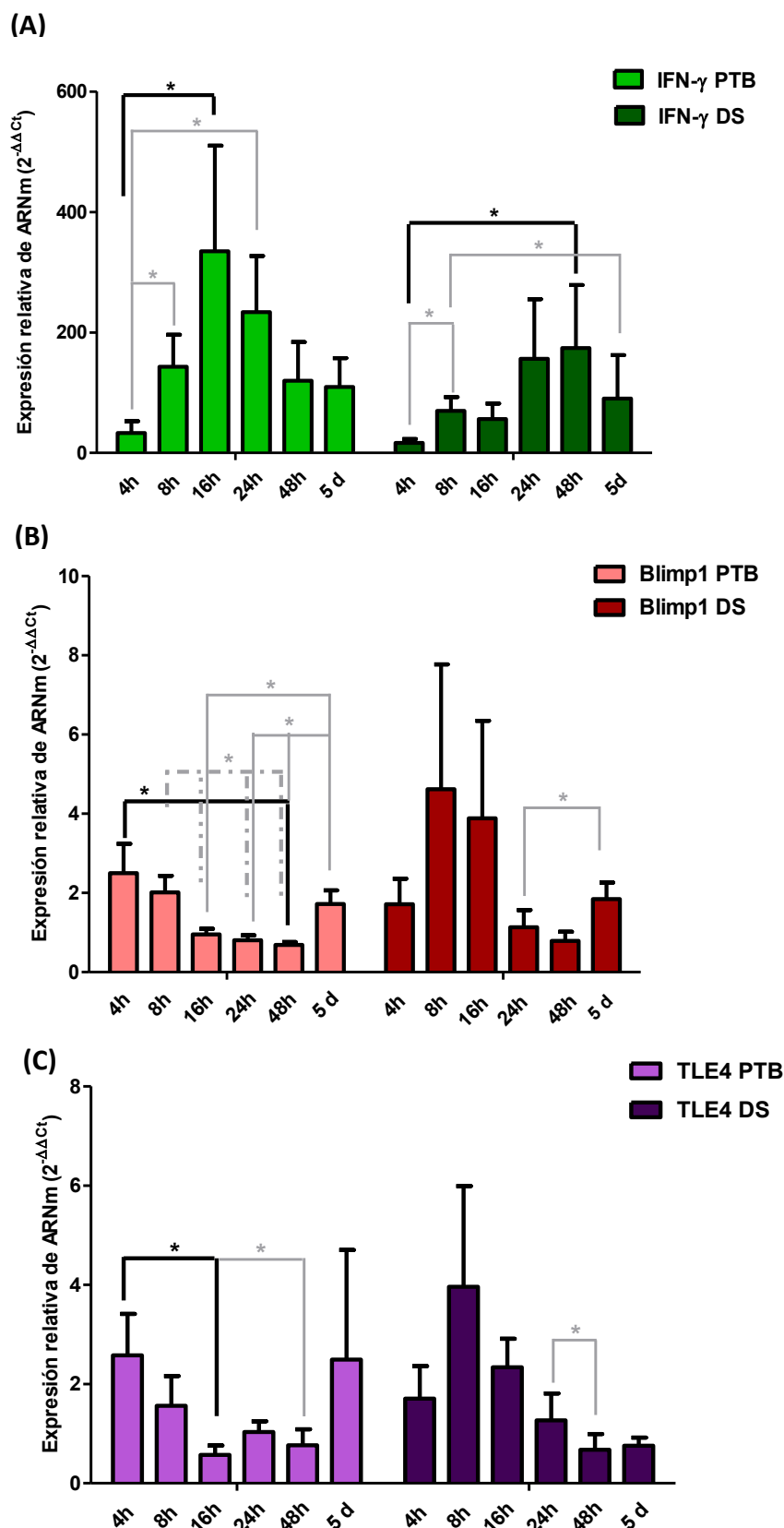


**Figura 17.** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de **(A)** Pacientes con Tuberculosis activa (PTB) y **(B)** Dadores Sanos (DS) fueron estimuladas con un sonicado de *M. tuberculosis* por 4 horas, 8 horas, 18 horas, 24 horas, 48 horas y 5 días. La expresión de Blimp1, TLE4 e IFN- $\gamma$  fue determinada por PCR en tiempo real. Se utilizó el método comparativo de cuantificación relativa luego de la normalización a GAPDH de la siguiente manera: Tasa de incremento =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = [Ct_{SAP} - Ct_{GAPDH}]$  y  $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{Mtb} - \Delta Ct_{Medio}]$ .



Al analizar la expresión de IFN- $\gamma$  se observaron diferencias en la cinética entre los dos grupos en estudio. La máxima expresión ocurre entre las 16 y 24 horas para los pacientes con tuberculosis activa, mientras que el pico de expresión para dadores sanos se encuentra entre las 24 y 48 horas. Además, la diferencia fue significativa cuando se comparó la expresión relativa de IFN- $\gamma$  en los tiempos de menor y mayor expresión en PTB (4h= 33,166 vs 16h= 334,807; p= 0,0156 \*, Test de Wilcoxon) y DS (4h= 16,622 vs 48h= 174,119; p= 0,013 \*, Test de Wilcoxon) (**Fig. 18A**). Blimp1 y TLE4 tienen una cinética similar dentro del grupo de pacientes, con mayor expresión a las 4 horas, 8 horas y 5 días, coincidentemente cuando la producción de ARNm de IFN- $\gamma$  disminuye. Sólo hubo diferencias significativas entre los tiempos de menor y mayor expresión para el grupo de pacientes (Blimp1 48h= 0,685 vs 4h= 2,500; p= 0,0156 \*, Test de Wilcoxon) (TLE4 16h= 0,572 vs 4h= 2,578; p= 0,0156 \*, Test de Wilcoxon) (**Figs. 18B y 18C**).

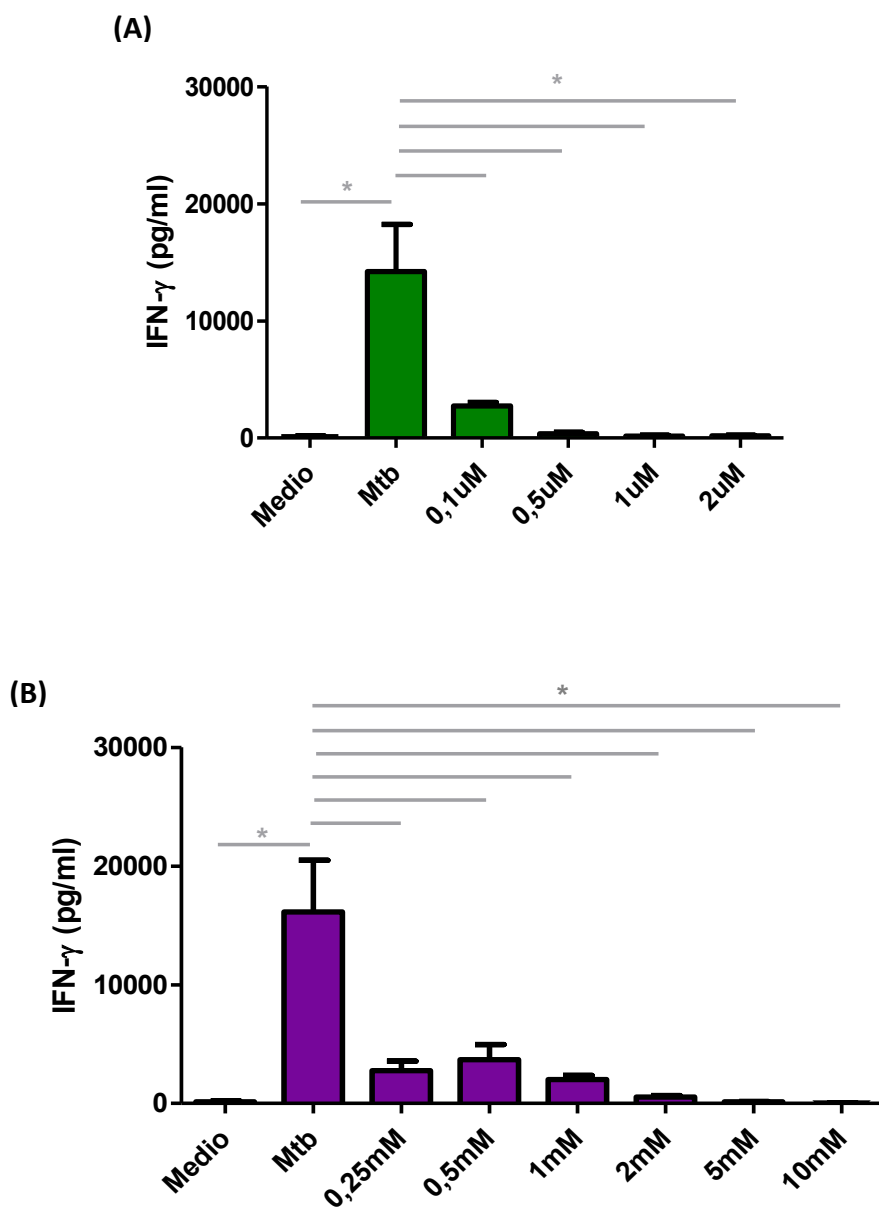
**Así, estos resultados sugerirían un rol represor de Blimp1 y TLE4 en el control de la expresión de IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con *M. tuberculosis***



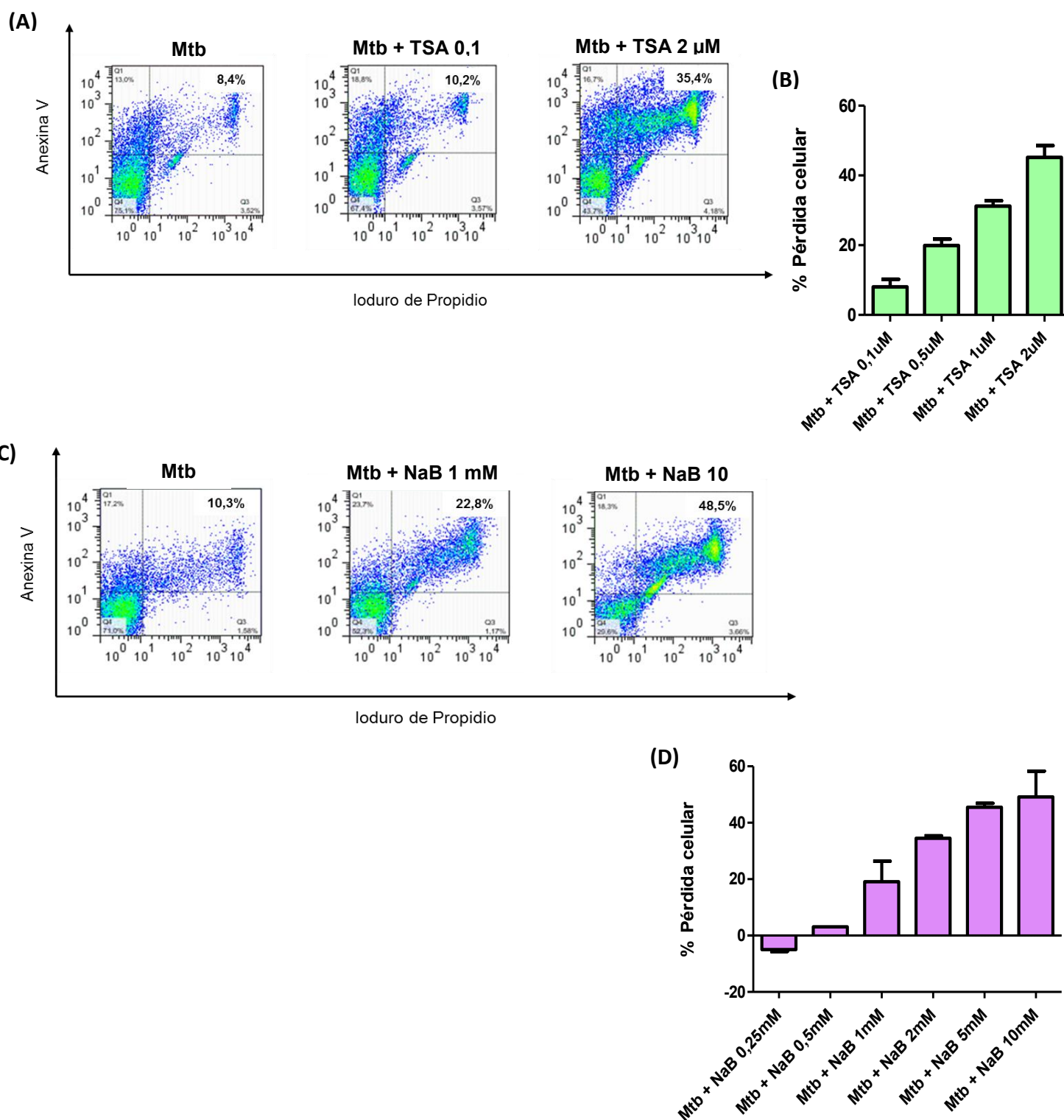
**Figura 18.** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de Pacientes con Tuberculosis activa (PTB) y Dadores Sanos (DS) fueron estimuladas con un sonicado de *M. tuberculosis* por 4 horas, 8 horas, 18 horas, 24 horas, 48 horas y 5 días. La expresión de (A) IFN- $\gamma$ , (B) Blimp1 y (C) TLE4 e fue determinada por PCR en tiempo real. Se utilizó el método comparativo de cuantificación relativa luego de la normalización a GAPDH de la siguiente manera: Tasa de incremento =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = [Ct_{SAP} - Ct_{GAPDH}]$  y  $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{Mtb} - \Delta Ct_{Medio}]$ . \*,  $p < 0,05$ , ANOVA no paramétrico y post test de Dunns para muestras pareadas.

## Tratamiento con inhibidores de deacetilasas TSA, NaB y MS 275

Para evaluar si las deacetilasas de histonas (HDACs) reclutadas por el complejo Blimp1/TLE4 participan en la represión génica de IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con *M. tuberculosis*, CMSP de dadores sanos fueron estimuladas con un sonicado de *M. tuberculosis* y tratadas con inhibidores de HDACs a dosis creciente. Luego de 48 horas se determinó la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. Contrariamente a lo esperado, se observó que la Tricostatina A (TSA) y el Butirato de sodio (NaB), inhiben significativamente la producción de IFN- $\gamma$  en todas las concentraciones testeadas ( $p < 0,05$  \*, Test de Wilcoxon (**Fig. 19A y 19B**)). Para determinar si la ausencia del efecto potenciador de la expresión génica de IFN- $\gamma$  de estos dos inhibidores de HDACs (iHDACs) podría deberse a la toxicidad que estos generan en las CMSP tratadas, se determinó la apoptosis celular utilizando Anexina V e Ioduro de propidio (IP). Se observó un incremento creciente de apoptosis tardía (CMSP Anexina V+/IP+) (**Fig. 20A y 20C**) y consecuentemente de pérdida de viabilidad celular a medida que se incrementó la dosis de TSA y de NaB (**Figs. 20B y 20D**). Por lo tanto, estos inhibidores no permiten descifrar si las HDCAs reclutadas por el complejo Blimp1/TLE4 participan en la regulación de la expresión de IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis*, dada su alta toxicidad.

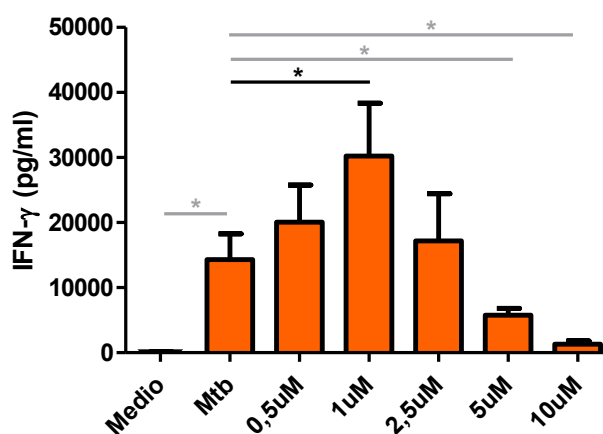


**Figura 19.** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de Dadores Sanos (DS) fueron estimuladas por 48 horas con un sonicado de *M. tuberculosis* y en presencia o ausencia de dosis crecientes de los inhibidores de deacetilasas **(A)** TSA (0,1 $\mu$ M - 2 $\mu$ M) y **(B)** NaB (0,25mM -10mM). La producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA. \*,  $p < 0,05$ , Test de Wilcoxon.

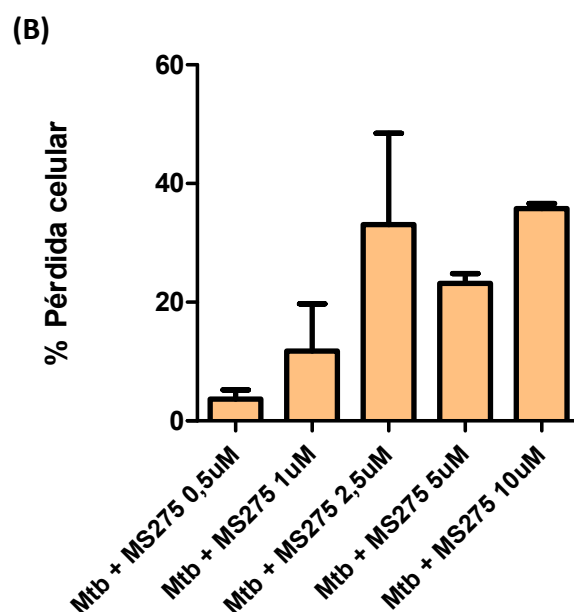
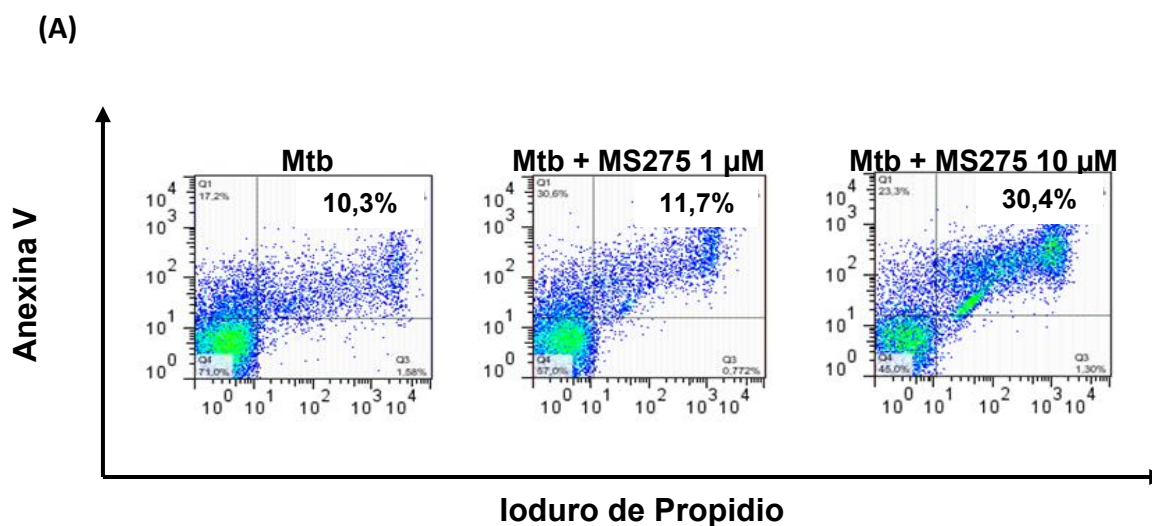


**Figura 20.** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de Dadores Sanos (DS) fueron estimuladas por 48 horas con un sonicatedo de *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de dosis crecientes de los inhibidores de deacetilasas **(A)** TSA (0,1μM - 2μM) y **(C)** NaB (0,25mM -10mM). Gráfico de puntos representativos del porcentaje de apoptosis celular determinado mediante citometría de flujo utilizando Anexina V e Ioduro de Propidio. El porcentaje de pérdida de celular para el tratamiento con **(B)** TSA y **(D)** NaB fue determinado como  $(1 - [\text{número de células viables (tratadas)} / \text{número de células viables (no tratadas)}]) \times 100$ .

Sin embargo, cuando se utilizó el iHDACs MS 275 la producción de IFN- $\gamma$  fue incrementada en aquellas dosis que no resultaron tóxicas para las células. A la concentración 1  $\mu$ M de este inhibidor se obtuvo la mayor producción de IFN- $\gamma$  y la diferencia fue significativa cuando se comparó con la condición estimulada con *M. tuberculosis* sin tratamiento con MS 275 (*Mtb*= 14293 pg/ml vs *Mtb* + 1  $\mu$ M= 30248 pg/ml;  $p= 0,0156$  \*, Test de Wilcoxon) (**Fig. 21**). A concentraciones experimentales superiores a 1  $\mu$ M se observó un incremento en la muerte celular y por consiguiente en el porcentaje de pérdida celular (**Fig. 22A y 22B**). Estos resultados demuestran que la deacetilación de las histonas es uno de los mecanismos de regulación negativa de la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis*, sugiriendo además que el complejo Blimp1/TLE4 podría estar involucrado en el control epigenético del IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, a través del reclutamiento de HDACs a la cromatina



**Figura 21.** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de Dadores Sanos (DS) fueron estimuladas por 48 horas con un sonocado de *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de dosis crecientes del inhibidor de deacetilasas MS275 (0,5 $\mu$ M - 10 $\mu$ M). La producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA. \*,  $p < 0,05$ , Test de Wilcoxon.



**Figura 22.** Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de Dadores Sanos (DS) fueron estimuladas por 48 horas con un sonicatedo de *M. tuberculosis* (*Mtb*) y en presencia o ausencia de dosis crecientes del inhibidor de deacetilasas MS275 (0,5 $\mu$ M - 10 $\mu$ M). **(A)** Gráfico de puntos representativos del porcentaje de apoptosis celular determinado mediante citometría de flujo utilizando Anexina V e Ioduro de Propidio. **(B)** El porcentaje de pérdida de celular fue determinado como  $(1 - [\text{número de células viables (tratadas)} / \text{número de células viables (no tratadas)}]) \times 100$ .

## Discusión





La Tuberculosis, enfermedad causada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* continúa siendo un importante problema para la salud pública a pesar de la existencia de programas nacionales e internacionales de control de la tuberculosis. Datos de la Organización Mundial de la Salud reportaron aproximadamente 9 millones de nuevos casos y 1,5 millones de muertes en el 2013. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*. El escenario en donde sólo 10% de la población infectada con *M. tuberculosis* progresa a tuberculosis activa, lleva a plantearse el siguiente interrogante: ¿Los pacientes con tuberculosis tienen una predisposición genética que los hace susceptibles a la enfermedad, o bien el desarrollo de la de la misma se debe a factores ambientales específicos? Factores ambientales tales como una pobre condición económica, malnutrición, estrés, antecedentes de tabaquismo entre otros, juegan un rol importante en la determinación de la susceptibilidad a la tuberculosis. Sin embargo, un importante indicio de un fuerte componente genético en la susceptibilidad a la tuberculosis radica en la diferencia que existe en la tasa de incidencia de esta enfermedad entre los distintos países, poblaciones y grupos étnicos alrededor del mundo (242). Un claro ejemplo de ello son los individuos europeos menos susceptibles a la tuberculosis, posiblemente debido al contacto con la bacteria por cientos de años lo que ha resultado en la selección de las poblaciones más resistentes. Sin embargo, en el África subsahariana, una población recientemente expuesta a *M. tuberculosis*, es mucho más susceptible. Un aspecto importante a tener en cuenta en los tiempos modernos, es el uso de tratamientos con drogas para contrarrestar la enfermedad, este hecho probablemente obstaculice el curso de la selección natural contra las variantes susceptibles en las poblaciones de África (79).

A lo largo de la historia humana, se han ido sucediendo cambios en el genoma debido a mutaciones espontáneas en el ADN. Estas mutaciones son fuente de variabilidad genética que han permitido adaptarnos constantemente a las variaciones ambientales. Como resultado de la deriva genética o la selección natural, las mutaciones con efecto neutral o beneficioso se han establecido en el genoma a lo largo de varias generaciones y se han convertido en variaciones comunes, que al estar presentes en más del 1% de la población se denominan polimorfismos. Exceptuando los gemelos monocigóticos, no existen dos individuos exactamente idénticos en su genoma, toda la variación interindividual radica en una diferencia de alrededor del 0,1% en la secuencia del genoma total (99). La forma más común de polimorfismo es el SNP, como se describió previamente los SNPs son la “marca genética de susceptibilidad” elegida en estudios de caso-control, debido a que son abundantes en el genoma y poco polimórficos. Pueden tener consecuencias funcionales según su localización en regiones génicas codificantes o no codificantes (243). Más aún, ha sido sugerido que la utilidad de los estudios de los SNPs para entender los mecanismos que determinan la respuesta variable a las drogas y en última instancia el tratamiento individualizado en base a la composición genómica de los individuos podría llegar a ser indispensable en un futuro cercano.

En los últimos años, se ha incrementado el interés en comprender el rol de los factores genéticos en el control de la resistencia/susceptibilidad a la tuberculosis, ya que permitiría una disección de la inmunidad anti-micobacterial, abriendo posibilidades de desarrollar medidas preventivas y terapias genotípico-específicas que puedan optimizar la respuesta inmune del paciente frente a la infección por *M. tuberculosis* (244). Muchos SNPs han sido estudiados en asociación a la tuberculosis, entre los que

se destacan genes del HLA, NRAMP1, IFNG, NOS2A, SP110, CCL2, MBL, CD209, VDR y TLR, algunos han sido asociados de manera repetida, mientras que otros no se asocian con la tuberculosis en todas las poblaciones estudiadas o no pudieron ser replicados (245).

La vía del IFN- $\gamma$  es una de las más estudiadas dado que esta citoquina juega un rol central en la generación de una respuesta inmune protectora frente a la infección por *M. tuberculosis* (246). Es producida mayormente por las células CD4+ del perfil Th1 y ayuda a la eliminación de las bacterias fagocitadas por los macrófagos induciendo la maduración del fagolisosoma (247) e induciendo la producción de péptidos antimicrobianos (248, 249). Un gran número de polimorfismos en el gen de IFN- $\gamma$  han sido relacionados con la expresión de esta citoquina y con la susceptibilidad a diferentes enfermedades (250). Más de 347 variantes del gen de IFN- $\gamma$  han sido identificadas, en diferentes poblaciones étnicas. Muchas de ellas confieren susceptibilidad a la tuberculosis y a la hepatitis, pero también han sido asociadas con condiciones no infecciosas como la anemia aplásica, el cáncer cervical y la psoriasis (250). Si bien, son numerosas las variaciones en el gen de IFN- $\gamma$  hay sólo dos variaciones genéticas que se conoce que pueden afectar la expresión de esta citoquina: una región de repetición polimórfica CA y el SNP +874T/A en el intrón 1, donde la presencia del alelo T correlaciona con el microsatélite CA que se asocia con mayor producción de IFN- $\gamma$  (102, 250). En el presente trabajo se evaluó la asociación del SNP de IFN- $\gamma$  +874 A/T con la susceptibilidad a la tuberculosis. Se observó una elevada frecuencia significativa del alelo A (79%) y del genotipo homocigota AA (64%) en pacientes con tuberculosis activa cuando se comparó con el grupo de individuos sanos e individuos con tuberculosis latente. Estos resultados concuerdan con lo

reportado en otras poblaciones alrededor del mundo donde se observó asociación del genotipo AA con la susceptibilidad a la tuberculosis (103-107). Sin embargo, cuando se analizó la producción de IFN- $\gamma$  en pacientes pertenecientes a los genotipos AA, AT y TT, no se hallaron diferencias entre los diferentes genotipos. Ha sido previamente reportado que el alelo A une menos preferentemente el factor de transcripción NF- $\kappa$ B con respecto al alelo T y por lo tanto disminuiría la tasa de transcripción génica del gen *IFNG* (102). Posiblemente en nuestra población de estudio existen variantes funcionales en el gen que codifica para el IFN- $\gamma$  o en otros genes cercanamente ligados a este, que estén influenciando la producción de la citoquina y necesiten ser estudiados (251). La depresión en la producción de IFN- $\gamma$  está asociada con formas severas de la enfermedad (252, 253). Teniendo en cuenta esto, la distribución de los genotipos del SNP +874 del IFN- $\gamma$  fue analizada en los pacientes con tuberculosis clasificados según las lesiones radiológicas o la respuesta *in vitro* frente a la estimulación con *M. tuberculosis*, como hemos reportado previamente (69). De acuerdo a lo esperado, al no hallar diferencias en la producción de IFN- $\gamma$  entre los 3 genotipos, no hemos encontrado asociación del genotipo susceptible AA con las formas más severas de la enfermedad. Por lo que concluimos que el SNP +874 A/T podría ser un marcador genético de susceptibilidad al desarrollo de tuberculosis activa en nuestra población en estudio. Sin embargo, no podría ser considerado un marcador de severidad de la enfermedad.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado previamente que la co-estimulación a través SLAM induce la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células T que han reconocido a antígenos de *M. tuberculosis* (69). Más aún, los pacientes con tuberculosis que presentan una menor severidad de la enfermedad expresan mayores niveles de SLAM

en sus células T (69). Mientras que la expresión de la proteína de unión a SLAM, SAP, correlaciona negativamente con la producción de IFN- $\gamma$  y la expresión de SLAM, y se asocia con una mayor severidad de la enfermedad (69). Estos antecedentes demostraron que la vía SLAM/SAP modula la respuesta Th1 en tuberculosis, sin embargo, los estudios realizados previamente nos planteaban nuevos interrogantes, ¿existen variaciones genéticas que determinen la expresión diferencial de estas proteínas en los pacientes con diferente severidad de la enfermedad? ¿Podrían variaciones genéticas en los genes de SLAM o de SAP explicar en parte las variaciones en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*? Teniendo en cuenta esto, se decidió incluir a *SLAM* como un gen candidato en nuestro estudio de búsqueda de marcadores genéticos de susceptibilidad a la tuberculosis. Hasta el momento no existen estudios de asociación entre SNPs de *SLAM* y esta enfermedad. Sin embargo, ha sido reportado asociación de los genotipos AA y GG de los SNPs -262 A/T y -188 A/G de *SLAM* con la susceptibilidad al lupus eritematoso sistémico en una población de pacientes chinos (116). Más aún, estos genotipos estuvieron correlacionados positivamente con una expresión incrementada del ARNm de *SLAM*, favoreciendo al desarrollo de esta patología autoinmune (116). Debido a la influencia que podrían tener estos dos SNPs en la expresión de *SLAM* decidimos estudiarlos en el contexto de la tuberculosis. Nuestros resultados demostraron una frecuencia mayor al 70% de los genotipos AA y GG de estos dos SNPs en los tres grupos en estudio. Estos datos concuerdan con lo hallado por *Suzuki y colaboradores* cuando analizaron estos SNPs en pacientes con artritis reumatoide (254). Sin embargo, no coinciden con lo reportado por *You y colaboradores* como se mencionó anteriormente cuando fueron analizados en la población de pacientes chinos con lupus (116). Por lo tanto, los genotipos AA y GG de

los SNPs de SLAM -262 A/T y -188 A/G no pueden ser considerados marcadores genéticos de susceptibilidad a la tuberculosis, debido a que están sobrerrepresentados tanto en el grupo de pacientes con tuberculosis activa, dadores sanos e individuos con tuberculosis latente. Sin embargo, al analizar la producción de IFN- $\gamma$  observamos diferencias significativas para el SNP -262 A/T de SLAM, el genotipo AA se asocia con menor producción de IFN- $\gamma$  en pacientes con tuberculosis. Estos resultados podrían indicar, que si bien estos SNPs no pueden ser considerados marcadores de susceptibilidad en nuestra población, el alelo A del SNP -262 podría tener implicancias funcionales río abajo, impactando en la producción de IFN- $\gamma$ . Demostrando además nuevamente y en concordancia con resultados previos de nuestro grupo de trabajo, el impacto de la vía de SLAM en la regulación de las respuesta Th1 en tuberculosis.

Debido a la falta de asociación de los SNP de la región promotora de *SLAM*, decidimos estudiar el polimorfismo +1343 G/T. Este SNP se ubica en la región codificante del gen y se trata de una mutación no sinónima que produce el cambio de una treonina por una prolina en la posición 333 de la secuencia aminoacídica de SLAM. Este cambio de aminoácido podría modificar la producción de IFN- $\gamma$  ya que la posición 333 es un sitio potencial de unión de SAP, el cual regula negativamente la producción de IFN- $\gamma$  inducida por SLAM en células estimuladas con *M. tuberculosis*. Ha sido reportado asociación del genotipo TT de este SNP con una baja producción de anticuerpos en respuesta a la infección con el virus del sarampión (119). Contrariamente a lo hallado por estos autores no hemos encontrado asociación del SNP +1343 G/T de SLAM con susceptibilidad a la tuberculosis debido a que, como se observó para los SNP -262 A/T y -188 A/G, el mismo genotipo (GG) estuvo representado en más del 70% de los individuos en los tres grupos en estudio.

La elevada frecuencia de un genotipo particular para los tres SNPs de SLAM analizados en este trabajo y la falta de asociación con la susceptibilidad a la tuberculosis puede explicarse por el hecho de que las poblaciones étnicas analizadas tienen diferente historia de mutación, migración, selección y deriva genética, lo que provoca diferencias sustanciales en las frecuencias genotípicas halladas (255). Asimismo, ninguno de los tres SNPs analizados habían sido estudiados en tuberculosis.

Otro gen considerado como candidato en el presente estudio fue *SH2D1A* que codifica para SAP. Como se describió previamente, esta proteína envía una señal inhibitoria que resulta en la atenuación selectiva de la secreción de IFN- $\gamma$  estimulada vía co-estimulación de SLAM (69, 70). Más aún, resultados no publicados de nuestro grupo de trabajo demuestran que el tratamiento con ARN de interferencia de SAP incrementa al menos parcialmente la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a *M. tuberculosis* en pacientes con tuberculosis que presentan altos niveles de SLAM y producción muy reducida de esta citoquina.

La unión de SAP a SLAM bloquea la capacidad de SLAM de interactuar con otras moléculas con dominio SH2. Por lo tanto, las funciones de SLAM están definidas por la presencia o ausencia de SAP (256). Sin embargo, SAP no sólo impide la unión de otras moléculas a SLAM, sino puede unirse a FynT, proteína tirosina quinasa de la familia Src. De esta manera, SAP actúa como un adaptador, permitiendo el acoplamiento a SLAM de proteínas de señalización capaces de fosforilar los residuos tirosina presentes en su extremo terminal. La vía SLAM/SAP/FynT aumenta la activación de NF- $\kappa$ B dependiente del TCR y PKC- $\theta$ . Esta asociación parece ser crítica para promover la producción de citoquinas de tipo Th2 (257). La importancia de la interacción SLAM-SAP en linfocitos T deriva de la observación que SAP se encuentra mutado en pacientes con síndrome

linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP). Los pacientes que presentan esta condición se caracterizan por una elevada susceptibilidad y una respuesta inmunológica inapropiada contra la infección por el virus de Epstein-Barr (256). Estos individuos presentan linfoproliferación excesiva luego de la infección con el virus conduciendo a necrosis y muerte tisular. Más aún, la ausencia de SAP en pacientes XLP afecta las interacciones inducidas por SLAM entre linfocitos T y B. Como la unión de SLAM durante la estimulación antígeno-específica de células T induce la producción de IFN- $\gamma$  y redirige fenotipos Th2 hacia respuestas Th0/Th1, una respuesta inapropiada de la subpoblación T colaboradora, en pacientes XLP, podría ser la consecuencia de un funcionamiento defectuoso de la vía SLAM/SAP. Más aún, en modelos murinos, la ausencia de SAP no solo causa hiperproliferación de las células productoras de IFN- $\gamma$ , sino también, la alteración en la activación del gen que codifica para IL-4, formación defectuosa del centro germinal B y un cambio aberrante de isotipos de inmunoglobulinas (258-260). Estos resultados sugieren que la ausencia de SAP conduce a fenotipos Th1 e inhibición de la producción de citoquinas Th2, como así también, SAP participaría en la homeostasis linfocitaria evitando la hiperproliferación que evidencian los pacientes XLP (260).

No existen reportes de estudios de asociación de SNP en el gen *SH2D1A* y la susceptibilidad a la tuberculosis. Sin embargo el SNP de SAP -346 C/T fue reportado en asociación con enfermedades linfoproliferativas asociadas a la deficiencia en la función de FAS (239). Los autores hallaron asociación del genotipo TT con un nivel incrementado de expresión del ARNm de SAP y producción de IFN- $\gamma$  disminuida, lo que predispone a los pacientes a desarrollar el síndrome autoinmune linfoproliferativo (ALPS) y la enfermedad autoinmune linfoproliferativa de Dianzani (DALD). Teniendo en



cuenta estos antecedentes, analizamos el SNP de SAP -346 C/T como posible marcador de riesgo para el desarrollo de tuberculosis. Además, estudiamos otros dos polimorfismos de SAP muy cercanos a este, los SNPs -631 A/G y -494 A/G. Nuestros resultados demostraron elevada frecuencia del genotipo TT en pacientes con tuberculosis activa (71%) e individuos con tuberculosis latente (61%) asociado con una menor producción de IFN- $\gamma$ . Por lo que, el SNP de SAP -346 C/T y más específicamente el genotipo TT no solo predispone a enfermedades linfoproliferativas sino también a la infección por *M. tuberculosis*. Esto demuestra que un mismo marcador genético puede utilizarse para testear la susceptibilidad en más de una patología que se manifiesta por falla en la regulación y/o función normal de una determinada molécula implicada, en este caso SAP. Además, cuando analizamos los SNPs de SAP -631 A/G y -494 A/G observamos que la frecuencia de los genotipos más frecuentes AA y GG respectivamente, fue de alrededor del 70% en los pacientes con tuberculosis activa y del 60% en individuos con tuberculosis latente. Valores similares a los hallados para el genotipo TT del SNP -346 C/T. Estos hallazgos nos llevaron a analizar estos tres SNPs en grupos de haplotipos, ya que por su cercanía cromosómica se espera que estén ligados. De acuerdo a lo esperado el haplotipo AA/GG/TT (SNPs-631 A/G, -494 A/G y -346 C/T) estuvo representado en el 71% de los pacientes con tuberculosis activa y en el 61% de los individuos con tuberculosis latente. Sumado a esto el haplotipo AA/GG/TT de SAP se asoció a una menor producción de IFN- $\gamma$  en individuos con tuberculosis activa. Estos resultados nos llevan a concluir que no solo el genotipo TT del SNP de SAP -346 C/T, sino el haplotipo AA/GG/TT podría ser un marcador de susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis*.

Si bien el haplotipo de SAP AA/GG/TT (SNPs-631 A/G, -494 A/G y -346 C/T) podría ser un marcador de susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis*, no existen diferencias entre las distribuciones de frecuencia entre pacientes con tuberculosis e individuos con infección latente, lo cual no podría proveer de un marcador que permita distinguir entre el estado de infección con progresión a enfermedad activa y la permanencia en el estado de latencia. Interesantemente, cuando analizamos la distribución del SNP de IFN- $\gamma$  +874 A/T dentro del haplotipo susceptible de SAP AA/GG/TT, hallamos diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre pacientes con tuberculosis activa e individuos con tuberculosis latente. Observamos que el 70% de los pacientes presentó el genotipo AA, mientras que el genotipo AT fue el más frecuente en latentes. Por lo que, portar además el genotipo AA podría estar asociado con mayor riesgo de desarrollar tuberculosis activa. Sin embargo, se necesitan estudios longitudinales por largos períodos de tiempo para demostrar esta hipótesis.

La tuberculosis es una enfermedad multifactorial con fuerte influencia del ambiente así como también de los factores genéticos, involucrando la participación de cientos de moléculas codificadas por cientos de genes, por lo que es más preciso aún analizar grupos de SNPs en moléculas claves en la respuesta inmune frente a la infección con *M. tuberculosis* para determinar un marcador genético eficaz de susceptibilidad. Varios autores han reportado estudios que involucran varios SNPs en la susceptibilidad a la tuberculosis (261-263). En el presente trabajo hallamos que luego del análisis de cuatro SNPs es posible considerar al haplotipo SAP/IFN- $\gamma$  AA/AA/GG/TT (SNPs IFN- $\gamma$  +874 A/T; SNPs de SAP -631 A/G, -494 A/G y -346 C/T) como un marcador genético

para el desarrollo de tuberculosis activa y como un posible marcador de riesgo de progresión de la infección a la enfermedad activa.

La respuesta a estímulos microbianos por parte de las células del sistema inmune del hospedador depende de un programa de expresión génica robusto y coordinado que involucra la transcripción de cientos de genes. La desregulación de estos programas contribuye significativamente a las marcadas diferencias en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas observadas entre los individuos y entre las poblaciones humanas. Los factores específicos que llevan a una respuesta inmune disfuncional frente a infección permanecen desconocidos. Sin embargo, se ha apreciado fuertemente la importancia de la influencia de las variaciones genéticas en los niveles de expresión alterada de genes inmuno-relacionados, posiblemente vía cambios epigenéticos. Los estudios de genética y epigenética han estado desconectados por mucho tiempo, sin embargo la combinación de estos podría proveer explicaciones completas acerca de variación en la susceptibilidad a enfermedad. En nuestro trabajo logramos observar el efecto de la presencia de un determinado SNP en la regulación de la transcripción génica. Más específicamente, analizamos el posible efecto funcional del SNP de SAP -346 C/T en la expresión del ARNm de SAP. La citosina presente en este SNP es plausible de ser metilada y por lo tanto la presencia de este alelo influiría negativamente en la expresión de SAP, ya que la metilación es un mecanismo epigenético que contribuye al silenciamiento génico. De acuerdo a lo esperado, hallamos que la expresión del ARNm de SAP estuvo significativamente aumentada en aquellos pacientes con tuberculosis activa que portan el genotipo TT, respecto de los individuos heterocigotas que portan una copia del alelo C. Además, como se mencionó anteriormente el genotipo TT estuvo asociado a una menor producción de IFN- $\gamma$  en

pacientes con tuberculosis y a la susceptibilidad a la tuberculosis. Estos resultados concuerdan con los hallados por *Boggio y colaboradores* (239), quienes hallaron asociación del genotipo TT del SNP de SAP +346 C/T con la expresión aumentada del ARNm de *SH2D1A* en pacientes con enfermedades linfoproliferativas. Son necesarios estudios de metilación del gen de SAP para demostrar de manera directa que es la metilación del sitio -346 lo que induce la represión de la expresión de SAP en los pacientes con tuberculosis que cargan el alelo C. Por último, es importante destacar que en dadores sanos, la presencia del alelo C se asoció con menor producción de IFN- $\gamma$ , en clara contraposición con los resultados obtenidos en pacientes con tuberculosis activa. Al respecto, es importante tener en cuenta que SAP se expresa en las células T, NK, NKT, CD8, macrófagos y algunas células B. Y como se describió previamente es capaz de regular diversos procesos inmunológicos. Más aún, esta proteína estaría involucrada en la homeostasis celular. Resultados no publicados de nuestro grupo de trabajo demuestran que SAP, a través de la unión a NTB-A (otro miembro de la familia de SLAM), media el proceso de apoptosis inducida por reactivación, un mecanismo central en la etapa de contracción de la respuesta inmune. Así, es necesario, evaluar la asociación de los SNPs de SAP con los diferentes mecanismos inmunológicos mediados por esta molécula en los diferentes tipos celulares para comprender el impacto funcional de los SNPs de SAP en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*.

El epigenoma conecta al genoma con el ambiente celular para determinar su identidad funcional. Los estímulos ambientales externos (infección, agentes químicos y drogas) e internos (citoquinas y hormonas) pueden modificar el perfil epigenético de los genes, modificando directamente su expresión e influenciando el tipo celular y la respuesta inmune (125). En los últimos años ha avanzado el conocimiento acerca de los

mecanismos epigenéticos involucrados en el desarrollo y diferenciación del sistema inmune y consecuentemente de las patologías relacionadas.

La metilación del ADN y las modificaciones post-transcripcionales de las histonas actúan en concierto para el establecimiento de las formas abierta y cerrada de la cromatina, definiendo en última instancia la activación o represión de la transcripción génica (125). Estas modificaciones epigenéticas se establecen en residuos específicos gracias a la acción de varias enzimas, incluidas las ADN metiltransferasas (DNMTs), acetiltransferasas de histonas (HATs), deacetilasas de histonas (HDACs), metiltransferasas de histonas (HMTs), entre las más estudiadas. Alteraciones aberrantes en estas enzimas o en sus blancos de acción pueden provocar cambios en la expresión génica, modificando la maquinaria celular alterando la homeostasis inmunológica normal.

El conocimiento de los mecanismos epigenéticos normales que ocurren en genes claves involucrados en la respuesta inmune a un determinado patógeno, permitiría determinar biomarcadores epigenéticos para el diagnóstico, tratamiento y monitoreo clínico de varias enfermedades infecciosas.

Por más de dos décadas se ha acumulado evidencia sobre la posibilidad de considerar la metilación del ADN como un marcador epigenético para el diagnóstico sobre todo en cáncer (146). Sin embargo, existe escasa bibliografía que reporte la existencia de marcadores epigenéticos asociados a enfermedades infecciosas. Existen numerosos estudios relacionados con la plasticidad de las células T para diferenciarse hacia diferentes linajes. La diferenciación a los linajes celulares Th1/Th2 está regulada por modificaciones epigenéticas en los genes de *IFNG*, *IL4* e *IL13*. Específicamente, el promotor de *IFNG* está hipermetilado en células T vírgenes humanas y demetilado

solamente durante la diferenciación hacia el linaje Th1 (188). En contraste, el promotor de *IL4* e *IL13* está altamente metilado en células T vírgenes y Th1 y parcialmente demetilado en células Th2 (264).

Ha sido reportado además, que la metilación *in vitro* del promotor de *IFNG* en líneas celulares Th1 reduce marcadamente la unión de distintos factores de transcripción, más específicamente el sitio CpG -53 resulta clave en la regulación transcripcional de este gen (194). Así, la hipermetilación del promotor del IFN- $\gamma$  podría ser otro mecanismo de regulación negativa de esta citoquina en los pacientes con tuberculosis; la cual podría involucrar una inhibición de la unión del factor de transcripción CREB (un regulador positivo de la producción del IFN- $\gamma$  (70, 240)). Previamente ha sido demostrado que la unión de CREB al promotor de IFN- $\gamma$  es clave en la inducción de esta citoquina en respuesta a la estimulación con *M. tuberculosis* (240, 265). Más aún, la co-estimulación a través de SLAM induce la producción de IFN- $\gamma$  a través de una vía de señalización que involucra a la proteína quinasa Erk y al factor de transcripción CREB en células estimuladas con *M. tuberculosis* (70, 71). De acuerdo a estos antecedentes investigamos el estado de metilación de la región promotora de *IFNG*, más específicamente del sitio CpG -53, a partir de muestras de sangre entera de pacientes con tuberculosis activa, individuos con tuberculosis latente y dadores sanos. Observamos un mayor porcentaje metilación en pacientes respecto a los dadores sanos e individuos con tuberculosis latente, encontrando además diferencias significativas entre pacientes con tuberculosis activa e individuos infectados. La elevada metilación observada en muestras de sangre de los pacientes, sugiere una falla en la regulación epigenética de este sitio. Esta metilación aberrante llevaría a una baja expresión de IFN- $\gamma$ , posiblemente influenciando la severidad de la enfermedad. Lo

observado en nuestros resultados lleva a preguntarse si se trata de un rol causal en la patogénesis de la tuberculosis o es una consecuencia directa o indirecta de la enfermedad y serviría como un biomarcador de actividad de la enfermedad. *Esterhuyse, M. y colaboradores* han sugerido que la variación pre-existente en el epigenoma de poblaciones celulares específicas puede afectar potencialmente la susceptibilidad del hospedador a la infección (187). Si las variaciones epigenéticas entre individuos infectados y enfermos son debidas a su epigenoma pre-existente o a un epigenoma reactivo luego de la infección o una combinación de ambos, es aún tema de debate.

Las marcas epigenéticas en histonas también condicionan la expresión de *IFNG*. En células Th1, el locus *IFNG* posee marcas de acetilación de la histona 4 (AcH4) y trimetilación de la histona 3 (H3K4me3), mientras que en células Th2 se presenta la di-trimetilación de la histona 3 (H3K27me2-3) (266). La presencia de marcas activadoras o represivas en las histonas hace a la cromatina más o menos permisiva a la unión de factores de transcripción. Es sabido que en células del perfil Th1, el factor de transcripción T-bet se une a las regiones promotoras proximal (267, 268) y distal (224, 269) permitiendo la expresión selectiva de IFN- $\gamma$ . Contrariamente, Blimp1 fue uno de los primeros represores de la expresión de IFN- $\gamma$  en ser identificado. Se une específicamente a una secuencia altamente conservada en murinos y humanos ubicada a 22 kilobases (kb) aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de *IFNG*. Esta región de 22 kb se caracteriza por presentar marcas de histona 3 metilada (H3K4) en células Th1 y metilación de la histona 3 (H3K27) en células Th2 (188). Más aún, esta región es requerida para el control de la expresión de IFN- $\gamma$  en células T CD4, T CD8 y NK (224). Además, Blimp1 atenúa la diferenciación hacia un perfil Th1 reprimiendo a

*TBX21* (gen que codifica para el factor de transcripción T-bet) y a *IFNG* (218). Por otra parte, TLE4 es un miembro de la familia de co-represores Groucho que no posee dominio de unión al ADN, sin embargo, es reclutado por Blimp1 a la secuencia de 22kb en la región promotora proximal de *IFNG*. Blimp1 y TLE4 forman un complejo represor que atrae deacetilasas de histonas (HDACs) del tipo I (HDAC1), II (HDAC2) y metiltransferasas (Suv39H1) encargadas de las marcas represivas, deacetilación de la histona 3 (H3) e histona (H4) y trimetilación de la histona 3 (H3K9) que resultan en el silenciamiento de *IFNG* en células T anérgicas (232). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos determinar si el represor génico Blimp1 y el co-represor TLE4 regulan la expresión de IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*. Nuestros resultados demostraron que tanto Blimp1 como TLE4 podrían regular negativamente la producción de IFN- $\gamma$  ya que están mayormente expresados cuando se detectó menor nivel de expresión del ARNm de IFN- $\gamma$ . Más aún, para evaluar indirectamente si Blimp1 unido a TLE4 recluta HDACs para producir la represión génica de *IFNG*, utilizamos inhibidores de deacetilasas de histonas (iHDACs). Cuando se utilizó iHDACs de amplio espectro, tricostatina A (TSA) y butirato de sodio (NaB) se detectaron efectos tóxicos, generando altos porcentajes de apoptosis de las células tratadas. Sin embargo, observamos un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  cuando se utilizó la benzamida (MS275), un iHDAC que tiene como blanco específicamente HDACs del tipo I. Interesantemente, estos resultados concuerdan como se mencionó anteriormente con lo que ocurre en células T anérgicas, en las cuales Blimp1 y TLE4 unen HDACs del tipo I y II a la secuencia de 22Kb para reprimir la expresión de *IFNG*. Por lo que concluimos que el complejo represor Blimp1/TLE4 podría regular la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección con *M. tuberculosis* probablemente



mediante el reclutamiento de deacetilasas de histonas del tipo I. Uno de los objetivos planteados a futuro es determinar la unión de Blimp1 y de TLE4 al promotor de IFN- $\gamma$  y el reclutamiento de las deacetilasas de histonas mediante la técnica de precipitación de la cromatina. Más aún, esperamos caracterizar la metilación del ADN del IFN- $\gamma$  en poblaciones celulares purificadas y lograr una mejor comprensión de los mecanismos epigenéticos de regulación del IFN- $\gamma$ .

Por último, si bien es tentador pensar en nuevas herramientas de intervención, el desarrollo de “drogas epigenéticas” para enfermedades infecciosas sigue sin concretarse. De manera más realista, ha sido propuesto que los marcadores epigenéticos podrían proveer una nueva marca registrada/firma para la discriminación entre infección latente y tuberculosis activa, para monitorear la respuesta al tratamiento, y a largo plazo, como predictores del riesgo de progresión de la latencia a la enfermedad activa.

**En conjunto nuestros resultados demuestran que existen variaciones genéticas y epigenéticas, que junto con factores ambientales diversos, determinan la respuesta inmune del hospedador frente a *M. tuberculosis*.**

**Aunque serán necesarios varios años de investigación para que los descubrimientos acerca de la susceptibilidad genética de la tuberculosis sean aplicados en la clínica, la era de la medicina personalizada ya está en marcha, y se espera que no pase mucho tiempo hasta que finalmente se admita que los beneficios de la genética personalizada pueden extenderse desde condiciones tales como las enfermedades cardiovasculares a enfermedades infecciosas como la tuberculosis (245). Si podemos identificar qué individuos son potencialmente más vulnerables, podrían diseñarse**

**estrategias de vacunación diferenciales o establecerse un mayor grado de sospecha y modificaciones del tratamiento profiláctico frente a la exposición a la tuberculosis en estos individuos.**

# Conclusiones



- ❖ En búsqueda de marcadores genéticos de susceptibilidad a la Tuberculosis hallamos que el haplotipo de SAP AA/GG/TT (SNPs-631 A/G, -494 A/G y -346 C/T) podría ser una marca genética de riesgo a la infección con *M. tuberculosis*. Más aún, el 70% de los pacientes además poseen el genotipo susceptible AA del SNP +874 A/T de IFN- $\gamma$  como una segunda marca de riesgo, y la combinación de ambos duplica los valores de OR y establece una marca de progresión hacia la enfermedad activa. ***Así, el haplotipo IFN- $\gamma$ /SAP AA/AA/GG/TT podría ser considerado un marcador de susceptibilidad a la tuberculosis.***
  
- ❖ Los SNPs de SLAM -262 A/T, -188 A/G y +1343 G/T no podrían ser considerados marcadores genéticos de susceptibilidad a la tuberculosis ya que en los tres grupos en estudio se observan los mismos genotipos.
  
- ❖ El alelo C del SNP de SAP -346 C/T al estar posiblemente metilado, se asocia a una disminución en la expresión del ARNm en pacientes con tuberculosis activa. SAP actúa como regulador negativo de la vía de IFN- $\gamma$  y este alelo C está asociado al aumento de la expresión de esta citoquina. De modo contrario, la presencia del alelo T permitiría la expresión de SAP y disminuiría la expresión de IFN- $\gamma$ , lo cual refuerza el hecho de que el genotipo TT del haplotipo AA/GG/TT pueda asociarse a susceptibilidad a la tuberculosis.

- ❖ El elevado porcentaje de metilación del sitio CpG -53 de IFN- $\gamma$  observado en muestras de sangre de pacientes con tuberculosis activa llevaría a una disminución en la expresión de esta citoquina. El patrón de metilación identificado podría deberse a un efecto causal en la patogénesis de la tuberculosis o ser consecuencia directa o indirecta de la enfermedad. En este último caso esta marca epigenética podría servir como un biomarcador de predisposición/susceptibilidad o severidad de la enfermedad.
  
- ❖ Por último, nuestros resultados sugieren que el complejo Blimp1/TLE4 podría estar involucrado en el control de la expresión de IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*, posiblemente a través del reclutamiento de HDACS del tipo I a la cromatina.

## **Bibliografía**



1. Lerner, T.R., Borel, S. & Gutierrez, M.G. The innate immune response in human tuberculosis. *Cellular microbiology* **17**, 1277-1285 (2015).
2. Kaufmann, S.H. Tuberculosis vaccine development: strength lies in tenacity. *Trends in immunology* **33**, 373-379 (2012).
3. McShane, H., Jacobs, W.R., Fine, P.E., Reed, S.G., McMurray, D.N., Behr, M., Williams, A. & Orme, I.M. BCG: myths, realities, and the need for alternative vaccine strategies. *Tuberculosis (Edinb)* **92**, 283-288 (2012).
4. Young, D.B., Perkins, M.D., Duncan, K. & Barry, C.E., 3rd Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *The Journal of clinical investigation* **118**, 1255-1265 (2008).
5. Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munsiff, S.S., Watt, C.J. & Dye, C. Tuberculosis. *Lancet* **362**, 887-899 (2003).
6. Zumla, A., Atun, R., Maeurer, M., Mwaba, P., Ma, Z., O'Grady, J., Bates, M., Dheda, K., Hoelscher, M. & Grange, J. Viewpoint: Scientific dogmas, paradoxes and mysteries of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tropical medicine & international health : TM & IH* **16**, 79-83 (2011).
7. McNerney, R., Maeurer, M., Abubakar, I., Marais, B., McHugh, T.D., Ford, N., Weyer, K., Lawn, S., Grobusch, M.P., Memish, Z., Squire, S.B., Pantaleo, G., Chakaya, J., Casenghi, M., Migliori, G.B., Mwaba, P., Zijenah, L., Hoelscher, M., Cox, H., Swaminathan, S., Kim, P.S., Schito, M., Harari, A., Bates, M., Schwank, S., O'Grady, J., Pletschette, M., Ditui, L., Atun, R. & Zumla, A. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *The Journal of infectious diseases* **205 Suppl 2**, S147-158 (2012).
8. Whitworth, H.S., Scott, M., Connell, D.W., Donges, B. & Lalvani, A. IGRAs--the gateway to T cell based TB diagnosis. *Methods* **61**, 52-62 (2013).

9. Ahmad, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical & developmental immunology* **2011**, 814943 (2011).
10. Keane, J., Gershon, S., Wise, R.P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W.D., Siegel, J.N. & Braun, M.M. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* **345**, 1098-1104 (2001).
11. Brandli, O. The clinical presentation of tuberculosis. *Respiration; international review of thoracic diseases* **65**, 97-105 (1998).
12. Harisinghani, M.G., McCloud, T.C., Shepard, J.A., Ko, J.P., Shroff, M.M. & Mueller, P.R. Tuberculosis from head to toe. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* **20**, 449-470; quiz 528-449, 532 (2000).
13. Storla, D.G., Yimer, S. & Bjune, G.A. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *BMC public health* **8**, 15 (2008).
14. Steingart, K.R., Henry, M., Ng, V., Hopewell, P.C., Ramsay, A., Cunningham, J., Urbanczik, R., Perkins, M., Aziz, M.A. & Pai, M. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *The Lancet. Infectious diseases* **6**, 570-581 (2006).
15. Pfyffer, G.E., Cieslak, C., Welscher, H.M., Kissling, P. & Rusch-Gerdes, S. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid-culture systems. *Journal of clinical microbiology* **35**, 2229-2234 (1997).
16. Boehme, C.C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M.P., Shenai, S., Krapp, F., Allen, J., Tahirli, R., Blakemore, R., Rustomjee, R., Milovic, A., Jones, M., O'Brien, S.M., Persing, D.H., Ruesch-Gerdes, S., Gotuzzo, E., Rodrigues, C., Alland, D. & Perkins, M.D. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* **363**, 1005-1015 (2010).
17. in *THE GLOBAL PLAN TO STOP TB 2011–2015* Geneva; 2010).



18. Schoch, O.D., Rieder, P., Tueller, C., Altpeter, E., Zellweger, J.P., Rieder, H.L., Krause, M. & Thurnheer, R. Diagnostic yield of sputum, induced sputum, and bronchoscopy after radiologic tuberculosis screening. *Am J Respir Crit Care Med* **175**, 80-86 (2007).
19. Reichman, L.B. Tuberculin skin testing. The state of the art. *Chest* **76**, 764-770 (1979).
20. Demissie, A., Leyten, E.M., Abebe, M., Wassie, L., Aseffa, A., Abate, G., Fletcher, H., Owiafe, P., Hill, P.C., Brookes, R., Rook, G., Zumla, A., Arend, S.M., Klein, M., Ottenhoff, T.H., Andersen, P., Doherty, T.M. & Group, V.S. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **13**, 179-186 (2006).
21. Pai, M., Riley, L.W. & Colford, J.M., Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *The Lancet. Infectious diseases* **4**, 761-776 (2004).
22. Andersen, P., Doherty, T.M., Pai, M. & Weldingh, K. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends in molecular medicine* **13**, 175-182 (2007).
23. Brock, I., Weldingh, K., Lillebaek, T., Follmann, F. & Andersen, P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *American journal of respiratory and critical care medicine* **170**, 65-69 (2004).
24. Lalvani, A., Pathan, A.A., Durkan, H., Wilkinson, K.A., Whelan, A., Deeks, J.J., Reece, W.H., Latif, M., Pasvol, G. & Hill, A.V. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* **357**, 2017-2021 (2001).
25. Mazurek, G.H., Jereb, J., Lobue, P., Iademarco, M.F., Metchock, B., Vernon, A., Division of Tuberculosis Elimination, N.C.f.H.I.V.S.T.D., Tb Prevention, C.f.D.C. & Prevention Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium*

- tuberculosis infection, United States. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control* **54**, 49-55 (2005).
26. Fox, W., Ellard, G.A. & Mitchison, D.A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* **3**, S231-279 (1999).
27. in *Tuberculosis: Clinical Diagnosis and Management of Tuberculosis, and Measures for Its Prevention and Control* (London; 2006).
28. Mitchison, D.A. Assessment of new sterilizing drugs for treating pulmonary tuberculosis by culture at 2 months. *Am Rev Respir Dis* **147**, 1062-1063 (1993).
29. Horne, D.J., Royce, S.E., Gooze, L., Narita, M., Hopewell, P.C., Nahid, P. & Steingart, K.R. Sputum monitoring during tuberculosis treatment for predicting outcome: systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases* **10**, 387-394 (2010).
30. Walzl, G., Ronacher, K., Hanekom, W., Scriba, T.J. & Zumla, A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nature reviews. Immunology* **11**, 343-354 (2011).
31. Cliff, J.M., Kaufmann, S.H., McShane, H., van Helden, P. & O'Garra, A. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. *Immunological reviews* **264**, 88-102 (2015).
32. Gonzalez-Cano, P., Mondragon-Flores, R., Sanchez-Torres, L.E., Gonzalez-Pozos, S., Silva-Miranda, M., Monroy-Ostria, A., Estrada-Parra, S. & Estrada-Garcia, I. Mycobacterium tuberculosis H37Rv induces ectosome release in human polymorphonuclear neutrophils. *Tuberculosis (Edinb)* **90**, 125-134 (2010).
33. Rohde, K., Yates, R.M., Purdy, G.E. & Russell, D.G. Mycobacterium tuberculosis and the environment within the phagosome. *Immunological reviews* **219**, 37-54 (2007).

34. Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J. & Russell, D.G. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**, 678-681 (1994).
35. Russell, D.G., Cardona, P.J., Kim, M.J., Allain, S. & Altare, F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature immunology* **10**, 943-948 (2009).
36. Adams, D.O. The granulomatous inflammatory response. A review. *The American journal of pathology* **84**, 164-192 (1976).
37. Sandor, M., Weinstock, J.V. & Wynn, T.A. Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. *Trends in immunology* **24**, 44-52 (2003).
38. Orme, I.M. & Basaraba, R.J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Seminars in immunology* **26**, 601-609 (2014).
39. Caceres, N., Tapia, G., Ojanguren, I., Altare, F., Gil, O., Pinto, S., Vilaplana, C. & Cardona, P.J. Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models. *Tuberculosis (Edinb)* **89**, 175-182 (2009).
40. D'Avila, H., Melo, R.C., Parreira, G.G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H.C. & Bozza, P.T. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* **176**, 3087-3097 (2006).
41. Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Orme, I.M. & Gonzalez-Juarrero, M. Foamy macrophages within lung granulomas of mice infected with Mycobacterium tuberculosis express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF receptor-associated factor family. *J Immunol* **175**, 3873-3881 (2005).

42. Peyron, P., Vaubourgeix, J., Poquet, Y., Levillain, F., Botanch, C., Bardou, F., Daffe, M., Emile, J.F., Marchou, B., Cardona, P.J., de Chastellier, C. & Altare, F. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS pathogens* **4**, e1000204 (2008).
43. Gonzalez-Juarrero, M., Turner, O.C., Turner, J., Marietta, P., Brooks, J.V. & Orme, I.M. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity* **69**, 1722-1728 (2001).
44. Cambier, C.J., Falkow, S. & Ramakrishnan, L. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* **159**, 1497-1509 (2014).
45. Middleton, A.M., Chadwick, M.V., Nicholson, A.G., Dewar, A., Groger, R.K., Brown, E.J., Ratliff, T.L. & Wilson, R. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with human respiratory mucosa. *Tuberculosis (Edinb)* **82**, 69-78 (2002).
46. Gold, M.C., Cerri, S., Smyk-Pearson, S., Cansler, M.E., Vogt, T.M., Delepine, J., Winata, E., Swarbrick, G.M., Chua, W.J., Yu, Y.Y., Lantz, O., Cook, M.S., Null, M.D., Jacoby, D.B., Harriff, M.J., Lewinsohn, D.A., Hansen, T.H. & Lewinsohn, D.M. Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS biology* **8**, e1000407 (2010).
47. Orme, I.M., Robinson, R.T. & Cooper, A.M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nat Immunol* **16**, 57-63 (2015).
48. Li, Y., Wang, Y. & Liu, X. The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. *Clinical & developmental immunology* **2012**, 791392 (2012).
49. Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L.A., Netea, M.G. & Van Crevel, R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical & developmental immunology* **2011**, 405310 (2011).

50. Chen, M., Gan, H. & Remold, H.G. A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J Immunol* **176**, 3707-3716 (2006).
51. Martin, C.J., Booty, M.G., Rosebrock, T.R., Nunes-Alves, C., Desjardins, D.M., Keren, I., Fortune, S.M., Remold, H.G. & Behar, S.M. Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell host & microbe* **12**, 289-300 (2012).
52. Bafica, A., Scanga, C.A., Serhan, C., Machado, F., White, S., Sher, A. & Aliberti, J. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1601-1606 (2005).
53. Chen, M., Divangahi, M., Gan, H., Shin, D.S., Hong, S., Lee, D.M., Serhan, C.N., Behar, S.M. & Remold, H.G. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE<sub>2</sub> and LXA<sub>4</sub> in the induction of macrophage death. *The Journal of experimental medicine* **205**, 2791-2801 (2008).
54. Divangahi, M., Desjardins, D., Nunes-Alves, C., Remold, H.G. & Behar, S.M. Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature immunology* **11**, 751-758 (2010).
55. Henderson, R.A., Watkins, S.C. & Flynn, J.L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **159**, 635-643 (1997).
56. Marino, S., Pawar, S., Fuller, C.L., Reinhart, T.A., Flynn, J.L. & Kirschner, D.E. Dendritic cell trafficking and antigen presentation in the human immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **173**, 494-506 (2004).
57. Eum, S.Y., Kong, J.H., Hong, M.S., Lee, Y.J., Kim, J.H., Hwang, S.H., Cho, S.N., Via, L.E. & Barry, C.E., 3rd Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest* **137**, 122-128 (2010).

58. Riedel, D.D. & Kaufmann, S.H. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with Mycobacterium tuberculosis and lipoarabinomannan. *Infection and immunity* **65**, 4620-4623 (1997).
59. Martineau, A.R., Newton, S.M., Wilkinson, K.A., Kampmann, B., Hall, B.M., Nawroly, N., Packe, G.E., Davidson, R.N., Griffiths, C.J. & Wilkinson, R.J. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J Clin Invest* **117**, 1988-1994 (2007).
60. Nunes-Alves, C., Booty, M.G., Carpenter, S.M., Jayaraman, P., Rothchild, A.C. & Behar, S.M. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat Rev Microbiol* **12**, 289-299 (2014).
61. Vankayalapati, R., Garg, A., Porgador, A., Griffith, D.E., Klucar, P., Safi, H., Girard, W.M., Cosman, D., Spies, T. & Barnes, P.F. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* **175**, 4611-4617 (2005).
62. Vankayalapati, R., Wize, B., Weis, S.E., Safi, H., Lakey, D.L., Mandelboim, O., Samten, B., Porgador, A. & Barnes, P.F. The Nkp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* **168**, 3451-3457 (2002).
63. Vankayalapati, R. & Barnes, P.F. Innate and adaptive immune responses to human Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* **89 Suppl 1**, S77-80 (2009).
64. Sutherland, J.S., Jeffries, D.J., Donkor, S., Walther, B., Hill, P.C., Adetifa, I.M., Adegbola, R.A. & Ota, M.O. High granulocyte/lymphocyte ratio and paucity of NKT cells defines TB disease in a TB-endemic setting. *Tuberculosis (Edinb)* **89**, 398-404 (2009).
65. Ismaili, J., Orlislagers, V., Poupot, R., Fournie, J.J. & Goldman, M. Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation. *Clin Immunol* **103**, 296-302 (2002).
66. Cruz, A., Khader, S.A., Torrado, E., Fraga, A., Pearl, J.E., Pedrosa, J., Cooper, A.M. & Castro, A.G. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-

- producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol* **177**, 1416-1420 (2006).
67. Nandi, B. & Behar, S.M. Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J Exp Med* **208**, 2251-2262 (2011).
68. Mishra, B.B., Rathinam, V.A., Martens, G.W., Martinot, A.J., Kornfeld, H., Fitzgerald, K.A. & Sasseti, C.M. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta. *Nat Immunol* **14**, 52-60 (2013).
69. Pasquinelli, V., Quiroga, M.F., Martinez, G.J., Zorrilla, L.C., Musella, R.M., Bracco, M.M., Belmonte, L., Malbran, A., Fainboim, L., Sieling, P.A. & Garcia, V.E. Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol* **172**, 1177-1185 (2004).
70. Pasquinelli, V., Townsend, J.C., Jurado, J.O., Alvarez, I.B., Quiroga, M.F., Barnes, P.F., Samten, B. & Garcia, V.E. IFN-gamma production during active tuberculosis is regulated by mechanisms that involve IL-17, SLAM, and CREB. *J Infect Dis* **199**, 661-665 (2009).
71. Pasquinelli, V., Rovetta, A.I., Alvarez, I.B., Jurado, J.O., Musella, R.M., Palmero, D.J., Malbran, A., Samten, B., Barnes, P.F. & Garcia, V.E. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases contributes to interferon gamma production in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **207**, 340-350 (2013).
72. Millet, J.P., Shaw, E., Orcau, A., Casals, M., Miro, J.M. & Cayla, J.A. Tuberculosis recurrence after completion treatment in a European city: reinfection or relapse? *PloS one* **8**, e64898 (2013).
73. Barnes, I., Duda, A., Pybus, O.G. & Thomas, M.G. Ancient urbanization predicts genetic resistance to tuberculosis. *Evolution; international journal of organic evolution* **65**, 842-848 (2011).

74. Campbell, M.C. & Tishkoff, S.A. African genetic diversity: implications for human demographic history, modern human origins, and complex disease mapping. *Annual review of genomics and human genetics* **9**, 403-433 (2008).
75. Parwati, I., van Crevel, R. & van Soolingen, D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains. *The Lancet. Infectious diseases* **10**, 103-111 (2010).
76. Azad, A.K., Sadee, W. & Schlesinger, L.S. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infection and immunity* **80**, 3343-3359 (2012).
77. Stead, W.W., Senner, J.W., Reddick, W.T. & Lofgren, J.P. Racial differences in susceptibility to infection by Mycobacterium tuberculosis. *The New England journal of medicine* **322**, 422-427 (1990).
78. Comstock, G.W. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Prophit survey. *Am Rev Respir Dis* **117**, 621-624 (1978).
79. Moller, M. & Hoal, E.G. Current findings, challenges and novel approaches in human genetic susceptibility to tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **90**, 71-83 (2010).
80. van der Eijk, E.A., van de Vosse, E., Vandenbroucke, J.P. & van Dissel, J.T. Heredity versus environment in tuberculosis in twins: the 1950s United Kingdom Prophit Survey Simonds and Comstock revisited. *American journal of respiratory and critical care medicine* **176**, 1281-1288 (2007).
81. Bellamy, R., Beyers, N., McAdam, K.P., Ruwende, C., Gie, R., Samaai, P., Bester, D., Meyer, M., Corrah, T., Collin, M., Camidge, D.R., Wilkinson, D., Hoal-Van Helden, E., Whittle, H.C., Amos, W., van Helden, P. & Hill, A.V. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8005-8009 (2000).
82. Cooke, G.S., Campbell, S.J., Bennett, S., Lienhardt, C., McAdam, K.P., Sirugo, G., Sow, O., Gustafson, P., Mwangulu, F., van Helden, P., Fine, P., Hoal, E.G. & Hill, A.V. Mapping



- of a novel susceptibility locus suggests a role for MC3R and CTSZ in human tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 203-207 (2008).
83. Mahasirimongkol, S., Yanai, H., Nishida, N., Ridruechai, C., Matsushita, I., Ohashi, J., Summanapan, S., Yamada, N., Moolphate, S., Chuchotaworn, C., Chaiprasert, A., Manosuthi, W., Kantipong, P., Kanitwittaya, S., Sura, T., Khusmith, S., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P. & Keicho, N. Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais. *Genes and immunity* **10**, 77-83 (2009).
84. Miller, E.N., Jamieson, S.E., Joberty, C., Fakiola, M., Hudson, D., Peacock, C.S., Cordell, H.J., Shaw, M.A., Lins-Lainson, Z., Shaw, J.J., Ramos, F., Silveira, F. & Blackwell, J.M. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes and immunity* **5**, 63-67 (2004).
85. Stein, C.M., Zalwango, S., Malone, L.L., Won, S., Mayanja-Kizza, H., Mugerwa, R.D., Leontiev, D.V., Thompson, C.L., Cartier, K.C., Elston, R.C., Iyengar, S.K., Boom, W.H. & Whalen, C.C. Genome scan of *M. tuberculosis* infection and disease in Ugandans. *PLoS one* **3**, e4094 (2008).
86. Mahasirimongkol, S., Yanai, H., Mushiroda, T., Promphittayarat, W., Wattanapokayakit, S., Phromjai, J., Yuliwulandari, R., Wichukchinda, N., Yowang, A., Yamada, N., Kantipong, P., Takahashi, A., Kubo, M., Sawanpanyalert, P., Kamatani, N., Nakamura, Y. & Tokunaga, K. Genome-wide association studies of tuberculosis in Asians identify distinct at-risk locus for young tuberculosis. *Journal of human genetics* **57**, 363-367 (2012).
87. Png, E., Alisjahbana, B., Sahiratmadja, E., Marzuki, S., Nelwan, R., Balabanova, Y., Nikolayevskyy, V., Drobniowski, F., Nejentsev, S., Adnan, I., van de Vosse, E., Hibberd, M.L., van Crevel, R., Ottenhoff, T.H. & Seielstad, M. A genome wide association study of pulmonary tuberculosis susceptibility in Indonesians. *BMC medical genetics* **13**, 5 (2012).

88. Thye, T., Vannberg, F.O., Wong, S.H., Owusu-Dabo, E., Osei, I., Gyapong, J., Sirugo, G., Sisay-Joof, F., Enimil, A., Chinbuah, M.A., Floyd, S., Warndorff, D.K., Sichali, L., Malema, S., Crampin, A.C., Ngwira, B., Teo, Y.Y., Small, K., Rockett, K., Kwiatkowski, D., Fine, P.E., Hill, P.C., Newport, M., Lienhardt, C., Adegbola, R.A., Corrah, T., Ziegler, A., Morris, A.P., Meyer, C.G., Horstmann, R.D. & Hill, A.V. Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nature genetics* **42**, 739-741 (2010).
89. Condit, C.M., Achter, P.J., Lauer, I. & Sefcovic, E. The changing meanings of "mutation:" A contextualized study of public discourse. *Human mutation* **19**, 69-75 (2002).
90. Brookes, A.J. The essence of SNPs. *Gene* **234**, 177-186 (1999).
91. Pacheco, A.G. & Moraes, M.O. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Disease markers* **27**, 173-186 (2009).
92. Gray, I.C., Campbell, D.A. & Spurr, N.K. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet* **9**, 2403-2408 (2000).
93. Wang, C., Chen, Z.L., Pan, Z.F., Wei, L.L., Xu, D.D., Jiang, T.T., Zhang, X., Ping, Z.P., Li, Z.J. & Li, J.C. NOD2 polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *International journal of biological sciences* **10**, 103-108 (2013).
94. Liu, P.T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B.H., Krutzik, S.R., Ochoa, M.T., Schaubert, J., Wu, K., Meinken, C., Kamen, D.L., Wagner, M., Bals, R., Steinmeyer, A., Zugel, U., Gallo, R.L., Eisenberg, D., Hewison, M., Hollis, B.W., Adams, J.S., Bloom, B.R. & Modlin, R.L. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **311**, 1770-1773 (2006).
95. Gao, L., Tao, Y., Zhang, L. & Jin, Q. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis: updated systematic review and meta-analysis. *The international journal*

- of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* **14**, 15-23 (2010).
96. Chen, C., Liu, Q., Zhu, L., Yang, H. & Lu, W. Vitamin D receptor gene polymorphisms on the risk of tuberculosis, a meta-analysis of 29 case-control studies. *PloS one* **8**, e83843 (2013).
97. Zhang, Y., Jiang, T., Yang, X., Xue, Y., Wang, C., Liu, J., Zhang, X., Chen, Z., Zhao, M. & Li, J.C. Toll-like receptor -1, -2, and -6 polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **8**, e63357 (2013).
98. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745 (2000).
99. Qu, H.Q., Fisher-Hoch, S.P. & McCormick, J.B. Knowledge gaining by human genetic studies on tuberculosis susceptibility. *Journal of human genetics* **56**, 177-182 (2011).
100. Delgado, J.C., Baena, A., Thim, S. & Goldfeld, A.E. Aspartic acid homozygosity at codon 57 of HLA-DQ beta is associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. *J Immunol* **176**, 1090-1097 (2006).
101. Stein, C.M. & Baker, A.R. Tuberculosis as a complex trait: impact of genetic epidemiological study design. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **22**, 91-99 (2011).
102. Pravica, V., Perrey, C., Stevens, A., Lee, J.H. & Hutchinson, I.V. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* **61**, 863-866 (2000).
103. Lio, D., Marino, V., Serauto, A., Gioia, V., Scola, L., Crivello, A., Forte, G.I., Colonna-Romano, G., Candore, G. & Caruso, C. Genotype frequencies of the +874T-->A single

- nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-gamma gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur J Immunogenet* **29**, 371-374 (2002).
104. Amim, L.H., Pacheco, A.G., Fonseca-Costa, J., Loredó, C.S., Rabahi, M.F., Melo, M.H., Ribeiro, F.C., Mello, F.C., Oliveira, M.M., Lapa e Silva, J.R., Ottenhoff, T.H., Kritski, A.L. & Santos, A.R. Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep* **35**, 563-566 (2008).
105. Tso, H.W., Ip, W.K., Chong, W.P., Tam, C.M., Chiang, A.K. & Lau, Y.L. Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes Immun* **6**, 358-363 (2005).
106. Mosaad, Y.M., Soliman, O.E., Tawhid, Z.E. & Sherif, D.M. Interferon-gamma +874 T/A and interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in Egyptian children with tuberculosis. *Scand J Immunol* **72**, 358-364 (2010).
107. Lopez-Maderuelo, D., Arnalich, F., Serantes, R., Gonzalez, A., Codoceo, R., Madero, R., Vazquez, J.J. & Montiel, C. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 970-975 (2003).
108. Pacheco, A., Cardoso, C. & Moraes, M. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Human Genetics* **123**, 477-484 (2008).
109. Akahoshi, M., Nakashima, H. & Shirakawa, T. Roles of genetic variations in signalling/immunoregulatory molecules in susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Semin Immunol* **18**, 224-229 (2006).
110. Wong, M. & Tsao, B.P. Current topics in human SLE genetics. *Springer Semin Immunopathol* **28**, 97-107 (2006).
111. Graham, R.R., Kozyrev, S.V., Baechler, E.C., Reddy, M.V., Plenge, R.M., Bauer, J.W., Ortmann, W.A., Koeuth, T., Gonzalez Escribano, M.F., Pons-Estel, B., Petri, M., Daly, M., Gregersen, P.K., Martin, J., Altshuler, D., Behrens, T.W. & Alarcon-Riquelme, M.E. A

- common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **38**, 550-555 (2006).
112. Hom, G., Graham, R.R., Modrek, B., Taylor, K.E., Ortmann, W., Garnier, S., Lee, A.T., Chung, S.A., Ferreira, R.C., Pant, P.V., Ballinger, D.G., Kosoy, R., Demirci, F.Y., Kamboh, M.I., Kao, A.H., Tian, C., Gunnarsson, I., Bengtsson, A.A., Rantapaa-Dahlqvist, S., Petri, M., Manzi, S., Seldin, M.F., Ronnblom, L., Syvanen, A.C., Criswell, L.A., Gregersen, P.K. & Behrens, T.W. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med* **358**, 900-909 (2008).
113. Remmers, E.F., Plenge, R.M., Lee, A.T., Graham, R.R., Hom, G., Behrens, T.W., de Bakker, P.I., Le, J.M., Lee, H.S., Batliwalla, F., Li, W., Masters, S.L., Booty, M.G., Carulli, J.P., Padyukov, L., Alfredsson, L., Klareskog, L., Chen, W.V., Amos, C.I., Criswell, L.A., Seldin, M.F., Kastner, D.L. & Gregersen, P.K. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* **357**, 977-986 (2007).
114. Prokunina, L., Castillejo-Lopez, C., Oberg, F., Gunnarsson, I., Berg, L., Magnusson, V., Brookes, A.J., Tentler, D., Kristjansdottir, H., Grondal, G., Bolstad, A.I., Svenungsson, E., Lundberg, I., Sturfelt, G., Jonssen, A., Truedsson, L., Lima, G., Alcocer-Varela, J., Jonsson, R., Gyllensten, U.B., Harley, J.B., Alarcon-Segovia, D., Steinsson, K. & Alarcon-Riquelme, M.E. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* **32**, 666-669 (2002).
115. Orozco, G., Sanchez, E., Gonzalez-Gay, M.A., Lopez-Nevot, M.A., Torres, B., Caliz, R., Ortego-Centeno, N., Jimenez-Alonso, J., Pascual-Salcedo, D., Balsa, A., de Pablo, R., Nunez-Roldan, A., Gonzalez-Escribano, M.F. & Martin, J. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **52**, 219-224 (2005).

116. You, Y., Wang, Z., Deng, G.H., Liu, Y. & Hao, F. Detection and functional evaluation of -262A/T and -188A/G polymorphisms of SLAM gene in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **37**, 2268-2272 (2010).
117. Ono, N., Tatsuo, H., Tanaka, K., Minagawa, H. & Yanagi, Y. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J Virol* **75**, 1594-1600 (2001).
118. Manchester, M., Valsamakis, A., Kaufman, R., Liszewski, M.K., Alvarez, J., Atkinson, J.P., Lublin, D.M. & Oldstone, M.B. Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2303-2307 (1995).
119. Dhiman, N., Poland, G.A., Cunningham, J.M., Jacobson, R.M., Ovsyannikova, I.G., Vierkant, R.A., Wu, Y. & Pankratz, V.S. Variations in measles vaccine-specific humoral immunity by polymorphisms in SLAM and CD46 measles virus receptors. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 666-672 (2007).
120. Veillette, A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* **6**, 56-66 (2006).
121. Komori, H., Furukawa, H., Mori, S., Ito, M.R., Terada, M., Zhang, M.C., Ishii, N., Sakuma, N., Nose, M. & Ono, M. A signal adaptor SLAM-associated protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-Faslpr lupus mice. *J Immunol* **176**, 395-400 (2006).
122. Boggio, E., Melensi, M., Bocca, S., Chiocchetti, A., Comi, C., Clemente, N., Orilieri, E., Soluri, M.F., D'Alfonso, S., Mechelli, R., Gentile, G., Poggi, A., Salvetti, M., Ramenghi, U. & Dianzani, U. The -346T polymorphism of the SH2D1A gene is a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation in males with defective Fas function. *Human Immunology* **73**, 585-592 (2012).
123. Esteller, M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**, 1148-1159 (2008).
124. Holliday, R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* **238**, 163-170 (1987).

125. Suarez-Alvarez, B., Baragano Raneros, A., Ortega, F. & Lopez-Larrea, C. Epigenetic modulation of the immune function: a potential target for tolerance. *Epigenetics* **8**, 694-702 (2013).
126. Sandoval, J. & Esteller, M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current opinion in genetics & development* **22**, 50-55 (2012).
127. Cedar, H. & Bergman, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews. Genetics* **10**, 295-304 (2009).
128. Probst, A.V., Dunleavy, E. & Almouzni, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 192-206 (2009).
129. Holliday, R. & Pugh, J.E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**, 226-232 (1975).
130. Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. & Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257 (1999).
131. Hansen, R.S., Wijmenga, C., Luo, P., Stanek, A.M., Canfield, T.K., Weemaes, C.M. & Gartler, S.M. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14412-14417 (1999).
132. Xu, G.L., Bestor, T.H., Bourc'his, D., Hsieh, C.L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J.J. & Viegas-Pequignot, E. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **402**, 187-191 (1999).
133. Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. & Ingram, V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *Journal of molecular biology* **203**, 971-983 (1988).

134. Bestor, T.H. & Ingram, V.M. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 5559-5563 (1983).
135. Hermann, A., Goyal, R. & Jeltsch, A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *The Journal of biological chemistry* **279**, 48350-48359 (2004).
136. Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R.D. & Roberts, R.J. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 33002-33010 (1999).
137. Robertson, K.D., Keyomarsi, K., Gonzales, F.A., Velicescu, M. & Jones, P.A. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic acids research* **28**, 2108-2113 (2000).
138. Li, E., Bestor, T.H. & Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915-926 (1992).
139. Illingworth, R.S. & Bird, A.P. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS letters* **583**, 1713-1720 (2009).
140. Fatemi, M., Pao, M.M., Jeong, S., Gal-Yam, E.N., Egger, G., Weisenberger, D.J. & Jones, P.A. Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic acids research* **33**, e176 (2005).
141. Lin, J.C., Jeong, S., Liang, G., Takai, D., Fatemi, M., Tsai, Y.C., Egger, G., Gal-Yam, E.N. & Jones, P.A. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer cell* **12**, 432-444 (2007).



142. Jones, P.A. & Liang, G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature reviews. Genetics* **10**, 805-811 (2009).
143. Ooi, S.K. & Bestor, T.H. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* **133**, 1145-1148 (2008).
144. Kriaucionis, S. & Heintz, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**, 929-930 (2009).
145. Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L. & Rao, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930-935 (2009).
146. Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89-92 (1983).
147. Jiang, M.H., Fei, J., Lan, M.S., Lu, Z.P., Liu, M., Fan, W.W., Gao, X. & Lu, D.R. Hypermethylation of hepatic Gck promoter in ageing rats contributes to diabetogenic potential. *Diabetologia* **51**, 1525-1533 (2008).
148. Javierre, B.M., Fernandez, A.F., Richter, J., Al-Shahrour, F., Martin-Subero, J.I., Rodriguez-Ubreva, J., Berdasco, M., Fraga, M.F., O'Hanlon, T.P., Rider, L.G., Jacinto, F.V., Lopez-Longo, F.J., Dopazo, J., Forn, M., Peinado, M.A., Carreno, L., Sawalha, A.H., Harley, J.B., Siebert, R., Esteller, M., Miller, F.W. & Ballestar, E. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome research* **20**, 170-179 (2010).
149. Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B. & Herman, J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research* **61**, 3225-3229 (2001).
150. Chen, T. & Dent, S.Y. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nature reviews. Genetics* **15**, 93-106 (2014).

151. Cheng, X. & Blumenthal, R.M. Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry* **49**, 2999-3008 (2010).
152. Momparler, R.L. Cancer epigenetics. *Oncogene* **22**, 6479-6483 (2003).
153. Choi, S.W. & Friso, S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Adv Nutr* **1**, 8-16 (2010).
154. Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A. & Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10014-10019 (2000).
155. Johnstone, R.W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature reviews. Drug discovery* **1**, 287-299 (2002).
156. Villagra, A., Sotomayor, E.M. & Seto, E. Histone deacetylases and the immunological network: implications in cancer and inflammation. *Oncogene* **29**, 157-173 (2010).
157. Heinzl, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* **387**, 43-48 (1997).
158. Schneider-Stock, R. & Ocker, M. Epigenetic therapy in cancer: molecular background and clinical development of histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors. *IDrugs : the investigational drugs journal* **10**, 557-561 (2007).
159. Ocker, M. & Schneider-Stock, R. Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 1367-1374 (2007).
160. Marks, P.A. & Xu, W.S. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *Journal of cellular biochemistry* **107**, 600-608 (2009).

161. Choi, J.H., Kwon, H.J., Yoon, B.I., Kim, J.H., Han, S.U., Joo, H.J. & Kim, D.Y. Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Japanese journal of cancer research : Gann* **92**, 1300-1304 (2001).
162. Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hara, Y., Kobayashi, S. & Iwase, H. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast\*. *Breast cancer research and treatment* **94**, 11-16 (2005).
163. Wilson, A.J., Byun, D.S., Popova, N., Murray, L.B., L'Italien, K., Sowa, Y., Arango, D., Velcich, A., Augenlicht, L.H. & Mariadason, J.M. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *The Journal of biological chemistry* **281**, 13548-13558 (2006).
164. Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S. & Iwase, H. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 6962-6968 (2004).
165. Marks, P.A. & Breslow, R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nature biotechnology* **25**, 84-90 (2007).
166. Mann, B.S., Johnson, J.R., Cohen, M.H., Justice, R. & Pazdur, R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *The oncologist* **12**, 1247-1252 (2007).
167. Bolden, J.E., Peart, M.J. & Johnstone, R.W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery* **5**, 769-784 (2006).
168. Hu, E., Dul, E., Sung, C.M., Chen, Z., Kirkpatrick, R., Zhang, G.F., Johanson, K., Liu, R., Lago, A., Hofmann, G., Macarron, R., de los Frailes, M., Perez, P., Krawiec, J., Winkler, J.

- & Jaye, M. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 720-728 (2003).
169. Gui, C.Y., Ngo, L., Xu, W.S., Richon, V.M. & Marks, P.A. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1241-1246 (2004).
170. Zopf, S., Neureiter, D., Bouralexis, S., Abt, T., Glaser, K.B., Okamoto, K., Ganslmayer, M., Hahn, E.G., Herold, C. & Ocker, M. Differential response of p53 and p21 on HDAC inhibitor-mediated apoptosis in HCT116 colon cancer cells in vitro and in vivo. *International journal of oncology* **31**, 1391-1402 (2007).
171. Fulda, S. Modulation of TRAIL-induced apoptosis by HDAC inhibitors. *Current cancer drug targets* **8**, 132-140 (2008).
172. Marks, P.A. & Jiang, X. Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. *Cell Cycle* **4**, 549-551 (2005).
173. Xu, Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell death and differentiation* **10**, 400-403 (2003).
174. Ruefli, A.A., Ausserlechner, M.J., Bernhard, D., Sutton, V.R., Tainton, K.M., Kofler, R., Smyth, M.J. & Johnstone, R.W. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10833-10838 (2001).
175. Ungerstedt, J.S., Sowa, Y., Xu, W.S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., Ngo, L., Holmgren, A., Jiang, X. & Marks, P.A. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 673-678 (2005).
176. Leng, C., Gries, M., Ziegler, J., Lokshin, A., Mascagni, P., Lentzsch, S. & Mapara, M.Y. Reduction of graft-versus-host disease by histone deacetylase inhibitor

- suberonylanilide hydroxamic acid is associated with modulation of inflammatory cytokine milieu and involves inhibition of STAT1. *Experimental hematology* **34**, 776-787 (2006).
177. Rosato, R.R., Kolla, S.S., Hock, S.K., Almenara, J.A., Patel, A., Amin, S., Atadja, P., Fisher, P.B., Dent, P. & Grant, S. Histone deacetylase inhibitors activate NF-kappaB in human leukemia cells through an ATM/NEMO-related pathway. *The Journal of biological chemistry* **285**, 10064-10077 (2010).
178. Kramer, O.H., Gottlicher, M. & Heinzl, T. Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **12**, 294-300 (2001).
179. Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T. & Kelly, W.K. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature reviews. Cancer* **1**, 194-202 (2001).
180. McLaughlin, F. & La Thangue, N.B. Histone deacetylase inhibitors open new doors in cancer therapy. *Biochemical pharmacology* **68**, 1139-1144 (2004).
181. Kelly, W.K., O'Connor, O.A. & Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert opinion on investigational drugs* **11**, 1695-1713 (2002).
182. Bhalla, K.N. Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 3971-3993 (2005).
183. Dokmanovic, M. & Marks, P.A. Prospects: histone deacetylase inhibitors. *Journal of cellular biochemistry* **96**, 293-304 (2005).
184. Johnstone, R.W. & Licht, J.D. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer cell* **4**, 13-18 (2003).
185. Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B. & Yao, T.P. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Molecular cell* **18**, 601-607 (2005).

186. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F. & Yao, T.P. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455-458 (2002).
187. Esterhuysen, M.M., Linhart, H.G. & Kaufmann, S.H. Can the battle against tuberculosis gain from epigenetic research? *Trends Microbiol* **20**, 220-226 (2012).
188. Schoenborn, J.R., Dorschner, M.O., Sekimata, M., Santer, D.M., Shnyreva, M., Fitzpatrick, D.R., Stamatoyannopoulos, J.A. & Wilson, C.B. Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. *Nature immunology* **8**, 732-742 (2007).
189. Chang, S. & Aune, T.M. Histone hyperacetylated domains across the Ifng gene region in natural killer cells and T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17095-17100 (2005).
190. Fields, P.E., Kim, S.T. & Flavell, R.A. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol* **169**, 647-650 (2002).
191. Wilson, C.B., Makar, K.W. & Perez-Melgosa, M. Epigenetic regulation of T cell fate and function. *The Journal of infectious diseases* **185 Suppl 1**, S37-45 (2002).
192. Thomas, R.M., Gamper, C.J., Ladle, B.H., Powell, J.D. & Wells, A.D. De novo DNA methylation is required to restrict T helper lineage plasticity. *The Journal of biological chemistry* **287**, 22900-22909 (2012).
193. Winders, B.R., Schwartz, R.H. & Bruniquel, D. A distinct region of the murine IFN-gamma promoter is hypomethylated from early T cell development through mature naive and Th1 cell differentiation, but is hypermethylated in Th2 cells. *J Immunol* **173**, 7377-7384 (2004).
194. Jones, B. & Chen, J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *The EMBO journal* **25**, 2443-2452 (2006).

195. Runyon, R.S., Cachola, L.M., Rajeshuni, N., Hunter, T., Garcia, M., Ahn, R., Lurmann, F., Krasnow, R., Jack, L.M., Miller, R.L., Swan, G.E., Kohli, A., Jacobson, A.C. & Nadeau, K.C. Asthma discordance in twins is linked to epigenetic modifications of T cells. *PLoS One* **7**, e48796 (2012).
196. Ouyang, B., Bernstein, D.I., Lummus, Z.L., Ying, J., Boulet, L.P., Cartier, A., Gautrin, D. & Ho, S.M. Interferon-gamma promoter is hypermethylated in blood DNA from workers with confirmed diisocyanate asthma. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **133**, 218-224 (2013).
197. Alexeeff, S.E., Baccarelli, A.A., Halonen, J., Coull, B.A., Wright, R.O., Tarantini, L., Bollati, V., Sparrow, D., Vokonas, P. & Schwartz, J. Association between blood pressure and DNA methylation of retrotransposons and pro-inflammatory genes. *International Journal of Epidemiology* **42**, 270-280 (2013).
198. Dong, R., Zhao, R. & Zheng, S. Changes in epigenetic regulation of CD4+ T lymphocytes in biliary atresia. *Pediatric research* **70**, 555-559 (2011).
199. Zhang, S., Crivello, A., Offenbacher, S., Moretti, A., Paquette, D.W. & Barros, S.P. Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology* **37**, 953-961 (2010).
200. Mikovits, J.A., Young, H.A., Vertino, P., Issa, J.P., Pitha, P.M., Turcoski-Corrales, S., Taub, D.D., Petrow, C.L., Baylin, S.B. & Ruscetti, F.W. Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in de novo methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production. *Molecular and cellular biology* **18**, 5166-5177 (1998).
201. Bonilla, V., Sobrino, F., Lucas, M. & Pintado, E. Epstein-Barr virus transformation of human lymphoblastoid cells from patients with fragile X syndrome induces variable changes on CGG repeats size and promoter methylation. *Molecular diagnosis : a*

- journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of molecular biology* **7**, 163-167 (2003).
202. Meier, K. & Brehm, A. Chromatin regulation: how complex does it get? *Epigenetics* **9**, 1485-1495 (2014).
203. Keller, A.D. & Maniatis, T. Only two of the five zinc fingers of the eukaryotic transcriptional repressor PRDI-BF1 are required for sequence-specific DNA binding. *Molecular and cellular biology* **12**, 1940-1949 (1992).
204. Gyory, I., Wu, J., Fejer, G., Seto, E. & Wright, K.L. PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nature immunology* **5**, 299-308 (2004).
205. Ancelin, K., Lange, U.C., Hajkova, P., Schneider, R., Bannister, A.J., Kouzarides, T. & Surani, M.A. Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nature cell biology* **8**, 623-630 (2006).
206. Keller, A.D. & Maniatis, T. Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression. *Genes Dev* **5**, 868-879 (1991).
207. Turner, C.A., Jr., Mack, D.H. & Davis, M.M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* **77**, 297-306 (1994).
208. Kallies, A., Hawkins, E.D., Belz, G.T., Metcalf, D., Hommel, M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D. & Nutt, S.L. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nature immunology* **7**, 466-474 (2006).
209. Chang, D.H., Angelin-Duclos, C. & Calame, K. BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid lineage. *Nature immunology* **1**, 169-176 (2000).
210. Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B.S., Lew, A.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M. & Nutt, S.L. Initiation of plasma-cell



- differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* **26**, 555-566 (2007).
211. Lin, K.I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C. & Calame, K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Molecular and cellular biology* **22**, 4771-4780 (2002).
212. Lin, Y., Wong, K. & Calame, K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* **276**, 596-599 (1997).
213. Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltnane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K. & Staudt, L.M. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17**, 51-62 (2002).
214. Sciammas, R. & Davis, M.M. Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *J Immunol* **172**, 5427-5440 (2004).
215. Gong, D. & Malek, T.R. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. *J Immunol* **178**, 242-252 (2007).
216. Martins, G.A., Cimmino, L., Liao, J., Magnusdottir, E. & Calame, K. Blimp-1 directly represses Il2 and the Il2 activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival. *The Journal of experimental medicine* **205**, 1959-1965 (2008).
217. Wang, L., van Panhuys, N., Hu-Li, J., Kim, S., Le Gros, G. & Min, B. Blimp-1 induced by IL-4 plays a critical role in suppressing IL-2 production in activated CD4 T cells. *J Immunol* **181**, 5249-5256 (2008).
218. Cimmino, L., Martins, G.A., Liao, J., Magnusdottir, E., Grunig, G., Perez, R.K. & Calame, K.L. Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. *J Immunol* **181**, 2338-2347 (2008).
219. Ise, W., Totsuka, M., Sogawa, Y., Ametani, A., Hachimura, S., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S. & Kaminogawa, S. Naive CD4<sup>+</sup> T cells exhibit distinct expression patterns of

- cytokines and cell surface molecules on their primary responses to varying doses of antigen. *J Immunol* **168**, 3242-3250 (2002).
220. Porter, C.M. & Clipstone, N.A. Sustained NFAT signaling promotes a Th1-like pattern of gene expression in primary murine CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **168**, 4936-4945 (2002).
221. Berenson, L.S., Ota, N. & Murphy, K.M. Issues in T-helper 1 development--resolved and unresolved. *Immunological reviews* **202**, 157-174 (2004).
222. Glimcher, L.H. & Murphy, K.M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* **14**, 1693-1711 (2000).
223. Lee, G.R., Kim, S.T., Spilianakis, C.G., Fields, P.E. & Flavell, R.A. T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. *Immunity* **24**, 369-379 (2006).
224. Hatton, R.D., Harrington, L.E., Luther, R.J., Wakefield, T., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Lallone, R.L., Murphy, K.M. & Weaver, C.T. A distal conserved sequence element controls Ifng gene expression by T cells and NK cells. *Immunity* **25**, 717-729 (2006).
225. Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S.H., Horton, H.F., Byrne, M.C. & Rao, A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* **109**, 719-731 (2002).
226. Palaparti, A., Baratz, A. & Stifani, S. The Groucho/transducin-like enhancer of split transcriptional repressors interact with the genetically defined amino-terminal silencing domain of histone H3. *The Journal of biological chemistry* **272**, 26604-26610 (1997).
227. Brantjes, H., Roose, J., van De Wetering, M. & Clevers, H. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic acids research* **29**, 1410-1419 (2001).

228. Flores-Saaib, R.D. & Courey, A.J. Analysis of Groucho-histone interactions suggests mechanistic similarities between Groucho- and Tup1-mediated repression. *Nucleic acids research* **28**, 4189-4196 (2000).
229. Jennings, B.H. & Ish-Horowicz, D. The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors. *Genome biology* **9**, 205 (2008).
230. Javed, A., Guo, B., Hiebert, S., Choi, J.Y., Green, J., Zhao, S.C., Osborne, M.A., Stifani, S., Stein, J.L., Lian, J.B., van Wijnen, A.J. & Stein, G.S. Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *Journal of cell science* **113 (Pt 12)**, 2221-2231 (2000).
231. Ren, B., Chee, K.J., Kim, T.H. & Maniatis, T. PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes Dev* **13**, 125-137 (1999).
232. Bandyopadhyay, S., Valdor, R. & Macian, F. Tle4 regulates epigenetic silencing of gamma interferon expression during effector T helper cell tolerance. *Mol Cell Biol* **34**, 233-245 (2014).
233. Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T. & Rao, A. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* **365**, 352-355 (1993).
234. Loh, C., Shaw, K.T., Carew, J., Viola, J.P., Luo, C., Perrino, B.A. & Rao, A. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *The Journal of biological chemistry* **271**, 10884-10891 (1996).
235. Baine, I., Abe, B.T. & Macian, F. Regulation of T-cell tolerance by calcium/NFAT signaling. *Immunological reviews* **231**, 225-240 (2009).
236. Etokebe, G.E., Bulat-Kardum, L., Johansen, M.S., Knezevic, J., Balen, S., Matakovic-Mileusnic, N., Matanic, D., Flego, V., Pavelic, J., Beg-Zec, Z. & Dembic, Z. Interferon-

- gamma gene (T874A and G2109A) polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *Scand J Immunol* **63**, 136-141 (2006).
237. Prabhu Anand, S., Harishankar, M. & Selvaraj, P. Interferon gamma gene +874A/T polymorphism and intracellular interferon gamma expression in pulmonary tuberculosis. *Cytokine* **49**, 130-133 (2010).
238. Hashemi, M., Sharifi-Mood, B., Nezamdoost, M., Moazeni-Roodi, A., Naderi, M., Kouhpayeh, H., Taheri, M. & Ghavami, S. Functional polymorphism of interferon-gamma (IFN-gamma) gene +874T/A polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. *Prague Med Rep* **112**, 38-43 (2011).
239. Boggio, E., Melensi, M., Bocca, S., Chiocchetti, A., Comi, C., Clemente, N., Orilieri, E., Soluri, M.F., D'Alfonso, S., Mechelli, R., Gentile, G., Poggi, A., Salvetti, M., Ramenghi, U. & Dianzani, U. The -346T polymorphism of the SH2D1A gene is a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation in males with defective Fas function. *Hum Immunol* **73**, 585-592 (2012).
240. Samten, B., Howard, S.T., Weis, S.E., Wu, S., Shams, H., Townsend, J.C., Safi, H. & Barnes, P.F. Cyclic AMP response element-binding protein positively regulates production of IFN-gamma by T cells in response to a microbial pathogen. *J Immunol* **174**, 6357-6363 (2005).
241. John, S.A. & Garrett-Sinha, L.A. Blimp1: a conserved transcriptional repressor critical for differentiation of many tissues. *Experimental cell research* **315**, 1077-1084 (2009).
242. Motulsky, A.G. Metabolic polymorphisms and the role of infectious diseases in human evolution. *Human biology* **32**, 28-62 (1960).
243. Aerts, J., Wetzels, Y., Cohen, N. & Aerssens, J. Data mining of public SNP databases for the selection of intragenic SNPs. *Human mutation* **20**, 162-173 (2002).
244. Tobin, D.M., Roca, F.J., Oh, S.F., McFarland, R., Vickery, T.W., Ray, J.P., Ko, D.C., Zou, Y., Bang, N.D., Chau, T.T., Vary, J.C., Hawn, T.R., Dunstan, S.J., Farrar, J.J., Thwaites, G.E.,

- King, M.C., Serhan, C.N. & Ramakrishnan, L. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell* **148**, 434-446 (2012).
245. Moller, M., de Wit, E. & Hoal, E.G. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS immunology and medical microbiology* **58**, 3-26 (2010).
246. Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G. & Orme, I.M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* **178**, 2243-2247 (1993).
247. Russell, D.G., VanderVen, B.C., Lee, W., Abramovitch, R.B., Kim, M.J., Homolka, S., Niemann, S. & Rohde, K.H. Mycobacterium tuberculosis wears what it eats. *Cell host & microbe* **8**, 68-76 (2010).
248. Fabri, M., Stenger, S., Shin, D.M., Yuk, J.M., Liu, P.T., Realegeno, S., Lee, H.M., Krutzik, S.R., Schenk, M., Sieling, P.A., Teles, R., Montoya, D., Iyer, S.S., Bruns, H., Lewinsohn, D.M., Hollis, B.W., Hewison, M., Adams, J.S., Steinmeyer, A., Zugel, U., Cheng, G., Jo, E.K., Bloom, B.R. & Modlin, R.L. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med* **3**, 104ra102 (2011).
249. O'Garra, A., Redford, P.S., McNab, F.W., Bloom, C.I., Wilkinson, R.J. & Berry, M.P. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **31**, 475-527 (2013).
250. Smith, N.L. & Denning, D.W. Clinical implications of interferon-gamma genetic and epigenetic variants. *Immunology* **143**, 499-511 (2014).
251. Vidyarani, M., Selvaraj, P., Prabhu Anand, S., Jawahar, M.S., Adhilakshmi, A.R. & Narayanan, P.R. Interferon gamma (IFNgamma) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *The Indian journal of medical research* **124**, 403-410 (2006).

252. Pathan, A.A., Wilkinson, K.A., Klenerman, P., McShane, H., Davidson, R.N., Pasvol, G., Hill, A.V. & Lalvani, A. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol* **167**, 5217-5225 (2001).
253. Sodhi, A., Gong, J., Silva, C., Qian, D. & Barnes, P.F. Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **25**, 617-620 (1997).
254. Suzuki, A., Yamada, R., Kochi, Y., Sawada, T., Okada, Y., Matsuda, K., Kamatani, Y., Mori, M., Shimane, K., Hirabayashi, Y., Takahashi, A., Tsunoda, T., Miyatake, A., Kubo, M., Kamatani, N., Nakamura, Y. & Yamamoto, K. Functional SNPs in CD244 increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nat Genet* **40**, 1224-1229 (2008).
255. Mori, M., Yamada, R., Kobayashi, K., Kawaida, R. & Yamamoto, K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *Journal of human genetics* **50**, 264-266 (2005).
256. Veillette, A. SAP: a molecular switch regulating the immune response through a unique signaling mechanism. *European journal of immunology* **33**, 1141-1144 (2003).
257. Li, W., Sofi, M.H., Rietdijk, S., Wang, N., Terhorst, C. & Chang, C.H. The SLAM-associated protein signaling pathway is required for development of CD4+ T cells selected by homotypic thymocyte interaction. *Immunity* **27**, 763-774 (2007).
258. Nichols, K.E., Koretzky, G.A. & June, C.H. SAP: natural inhibitor or grand SLAM of T cell activation? *Nature immunology* **2**, 665-666 (2001).
259. Cannons, J.L., Tangye, S.G. & Schwartzberg, P.L. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annual review of immunology* **29**, 665-705 (2011).
260. Czar, M.J., Kersh, E.N., Mijares, L.A., Lanier, G., Lewis, J., Yap, G., Chen, A., Sher, A., Duckett, C.S., Ahmed, R. & Schwartzberg, P.L. Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene

- SH2D1A/DSHP/SAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7449-7454 (2001).
261. Velez, D.R., Hulme, W.F., Myers, J.L., Weinberg, J.B., Levesque, M.C., Stryjewski, M.E., Abbate, E., Estevan, R., Patillo, S.G., Gilbert, J.R., Hamilton, C.D. & Scott, W.K. NOS2A, TLR4, and IFNGR1 interactions influence pulmonary tuberculosis susceptibility in African-Americans. *Human genetics* **126**, 643-653 (2009).
262. Moller, M., Nebel, A., van Helden, P.D., Schreiber, S. & Hoal, E.G. Analysis of eight genes modulating interferon gamma and human genetic susceptibility to tuberculosis: a case-control association study. *BMC infectious diseases* **10**, 154 (2010).
263. Ansari, A., Hasan, Z., Dawood, G. & Hussain, R. Differential combination of cytokine and interferon- gamma +874 T/A polymorphisms determines disease severity in pulmonary tuberculosis. *PLoS One* **6**, e27848 (2011).
264. Santangelo, S., Cousins, D.J., Winkelmann, N., Triantaphyllopoulos, K. & Staynov, D.Z. Chromatin structure and DNA methylation of the IL-4 gene in human T(H)2 cells. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **17**, 485-496 (2009).
265. Samten, B., Ghosh, P., Yi, A.K., Weis, S.E., Lakey, D.L., Gonsky, R., Pendurthi, U., Wizel, B., Zhang, Y., Zhang, M., Gong, J., Fernandez, M., Safi, H., Vankayalapati, R., Young, H.A. & Barnes, P.F. Reduced expression of nuclear cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding proteins and IFN-gamma promoter function in disease due to an intracellular pathogen. *J Immunol* **168**, 3520-3526 (2002).
266. Aune, T.M., Collins, P.L. & Chang, S. Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology* **126**, 299-305 (2009).
267. Teixeira, L.K., Fonseca, B.P., Vieira-de-Abreu, A., Barboza, B.A., Robbs, B.K., Bozza, P.T. & Viola, J.P. IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J Immunol* **175**, 5931-5939 (2005).

268. Soutto, M., Zhang, F., Enerson, B., Tong, Y., Boothby, M. & Aune, T.M. A minimal IFN-gamma promoter confers Th1 selective expression. *J Immunol* **169**, 4205-4212 (2002).
269. Shnyreva, M., Weaver, W.M., Blanchette, M., Taylor, S.L., Tompa, M., Fitzpatrick, D.R. & Wilson, C.B. Evolutionarily conserved sequence elements that positively regulate IFN-gamma expression in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12622-12627 (2004).



## **Agradecimientos**

A mi directora, la Dra. Virginia Pasquinelli, primero por haberme aceptado como uno de sus primeras becarias doctorales. Por la confianza, paciencia y apoyo permanente. Sobre todo por no coartarme la libertad de probar todos los experimentos que quisiera, aprecio mucho esa actitud que me hizo crecer en este mundo de la investigación. Se aprende día a día de muchos errores y gloriosos aciertos.

A la Dra. Verónica García por abrirme las puertas de su laboratorio y darme el espacio donde di mis primeros pasos en la ciencia. Por su cariño y apoyo.

A la UNNOBA (Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires) y a la ANPCyT (Agencia Nacional Científica y Tecnológica) por otorgarme la beca para realizar mi doctorado.

A la UNNOBA además por permitirme ser docente y de alguna manera retribuir todo lo que me han brindado profesionalmente.

A mis primeros compañeros y amigos del aquel entonces Departamento de Química Biológica de la Facultad de Exactas de la UBA. Javi, Romi, Bel, Anita, Delfi, Joaqui gracias por haberme ayudado en el día a día en la mesada, por enseñarme y por su amistad.

Especialmente a Rodri, gran compañero y amigo. Me adoptó cuando llegué al laboratorio y me siguió muy de cerca en las primeras pipeteadas. Sin él no hubiese sido lo mismo. Por nuestras charlas de experimentos y de la vida. En deuda con vos siempre.

A la gente del hoy CIBA-UNNOBA Junín, Carolina, Laura A., Laura P., Josefina T., Naty, Jose Torres, Giani, Sofi, Eli, Lety, Fio, Dai, Nadia y a mis compañeras del labo Anyi y

Josefina C. A todos gracias por el día a día, por su amistad y porque son excelentes personas y compañeros!!! Sé que siempre cuento con cualquiera de ustedes y me lo demostraron.

A la UNQ (Universidad Nacional de Quilmes) por admitirme en la Carrera de Doctorado mención Cs. Básicas y Aplicadas.

Al Dr. Alejandro Castello por aceptar ser mi co-director y por estar en completa predisposición en lo que necesite.

A mi consejero de doctorado Marcelo Arguelles, por haberme acompañado desde el principio con sus consejos. Gracias por haber estado siempre presente con mis dudas.

A mis amigas que fui recolectando durante este tiempo en Pergamino-Junín. Emilse, Naty A., Lola, Pau, Jose Torres, Naty M., Giani, Sofi, Eli, Lety, Fio, Dai, Nadia, Anyi. Gracias por escucharme y contenerme siempre. Su amistad es la parte linda de mis días.

A José García porque hace un año apareciste para *SUMAR*. Gracias por estar, aguantarme, escucharme, contenerme, consolarme. Por tu amor, que es más que una palabra para vos, me lo demostrás todos los días. Sin vos este año no hubiese sido igual...

Por último y especialmente a mi FAMILIA! Gracias porque a pesar de la gran distancia ESTAN. Gracias a mi papá Rubén y a mi mamá Lili que hicieron todo lo imposible para que pudiera estudiar, por el apoyo y el aguante en estos 30 años que me acompañan.

A mis tres hermanos Pelus, Toto y Naty por ser mis compañeros de aventura y de la vida...mis mejores amigos!!!