



Maio, Mariano Nicolás

# Alteraciones del metabolismo de las células dendríticas en la infección con *Mycobacterium 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:*

Maio, M. N. (2025). *Alteraciones del metabolismo de las células dendríticas en la infección con Mycobacterium tuberculosis*. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/5356>

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

## **Alteraciones del metabolismo de las células dendríticas en la infección con *Mycobacterium tuberculosis***

**TESIS DOCTORAL**

**Mariano Nicolás Maio**

[maio.mariano96@gmail.com](mailto:maio.mariano96@gmail.com)

### **Resumen**

La tuberculosis (TB) continúa siendo un problema de salud global, causando millones de muertes por año. Actualmente, no existen vacunas efectivas que combatan la TB de manera adecuada. La única vacuna disponible en regiones donde la TB es endémica es la Bacillus Calmette-Guérin (BCG), que es una vacuna atenuada. Aunque la BCG protege eficientemente contra la TB meníngea en infantes, su efectividad varía considerablemente en adolescentes y adultos.

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agente causal de la TB, presenta diversas adaptaciones que le permiten debilitar la respuesta inmune humana, tales como la capacidad de interferir en las funciones de las células dendríticas (DCs), lo que afecta el inicio y desarrollo de la inmunidad adaptativa. Existen evidencias que sugieren que, durante la TB, la migración de las DCs hacia los ganglios linfáticos drenantes se encuentra alterada, lo que enlentece el desarrollo de una inmunidad protectora mediada por células T específicas. Sin embargo, los mecanismos que provocan esta reducción en la migración de las DCs durante la TB no se comprenden completamente.

Por otro lado, está ampliamente aceptado que las vías metabólicas influyen en las funciones efectoras de las células inmunes, campo de estudio conocido como inmunometabolismo. En particular, la inducción de la glicólisis aeróbica se relaciona con la potenciación de los procesos de activación celular.

Teniendo en cuenta que el establecimiento de DCs inmunogénicas es un paso crucial para generar una respuesta inmune protectora contra Mtb, y que la vía glicolítica de las células inmunes está íntimamente asociada con la activación celular, nuestra hipótesis en esta tesis doctoral es que la modulación de la vía glicolítica impacta en la calidad de la respuesta inmune frente a Mtb y, por ende, en el curso de la enfermedad tuberculosa.

En este trabajo, demostramos que la infección con Mtb desencadena la glicólisis aeróbica mediada por el factor de transcripción HIF1A de manera dependiente del receptor de tipo

Toll (TLR) 2 en las DCs, siendo este perfil metabólico esencial para su migración. Observamos que la inhibición tanto de la glicólisis (mediante el uso del fármaco oxamato), como de la actividad de HIF1A (utilizando PX-478), anula por completo la migración de las DCs a los ganglios linfáticos inducida por Mtb tanto en modelos in vitro como in vivo. Además, utilizamos un modelo de BCG en murinos que nos permitió observar que una menor actividad migratoria de las DCs expuestas a un inhibidor de HIF1A se traduce en una disminución del número de células T CD4+ productoras de IFN- $\gamma$  específicas para Mtb en las etapas tempranas posteriores a la inmunización. Esto sugiere que la actividad de HIF1A también es crucial para la migración de DCs infectadas con BCG hacia los ganglios linfáticos y, potencialmente, para promover la respuesta inmune adaptativa.

Curiosamente, encontramos que las DCs derivadas de monocitos de pacientes con TB presentaron una deficiencia en la activación de su glicólisis y su capacidad migratoria en respuesta a Mtb. A pesar de esto, los precursores de estas DCs, en particular las poblaciones de monocitos CD16+, exhibieron una alta capacidad glicolítica en comparación con los monocitos derivados de individuos sanos. Nuestros resultados indican también que la glicólisis exacerbada depende de las inmunoglobulinas de tipo G presentes en el plasma de pacientes tuberculosos.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que el estado altamente glicolítico de los monocitos circulantes de los pacientes con TB los torna refractarios a la generación de DCs migratorias, lo que podría explicar el retraso en la migración de estas células durante el curso de la enfermedad, y abrir nuevos caminos para el diseño racional de estrategias terapéuticas dirigidas contra moléculas del hospedador a fin de controlar la TB.

**PALABRAS CLAVES: CÉLULAS DENDRÍTICAS – GLICÓLISIS – HIF1A –MIGRACIÓN - MONOCITOS – TUBERCULOSIS.**

## **Abstract**

Tuberculosis (TB) remains a significant global health problem, causing millions of deaths each year. Currently, there are no effective vaccines that adequately combat TB. The only vaccine available in regions where TB is common is the Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine, which is a live attenuated vaccine. Although BCG efficiently protects against meningitis due to TB, in infants, its effectiveness varies widely among adolescents and adults. Mycobacterium tuberculosis (Mtb), the causative agent of TB, has several adaptations that allow it to weaken the human immune response, such as the ability to interfere with the functions of dendritic cells (DCs), thereby affecting the initiation and development of adaptive immunity. Evidence suggests that during TB, migration of DCs to the draining lymph nodes is altered, hindering the rapid development of protective T-cell mediated immunity. However, the mechanisms involved in the delayed migration of DCs during TB are still poorly defined.

On the other hand, it is widely accepted that the metabolic pathways influence the effector functions of immune cells, a field of study known as immunometabolism. In particular, the induction of aerobic glycolysis is linked to the enhancement of cellular activation processes. Therefore, considering that the establishment of immunogenic DCs represents a crucial step for generating a protective immune response against Mtb, and that the glycolytic pathway in immune cells is intimately intertwined with cellular activation, our hypothesis in this doctoral thesis is that the modulation of the glycolytic pathway impacts the quality of the immune response to Mtb, and, consequently, the course of the TB disease.

In this work, we found that infection of DCs with Mtb triggers aerobic glycolysis mediated by the transcription factor HIF1A in a Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent manner in DCs, with this metabolic profile being essential for their migration. We observed that the inhibition of both glycolysis (using the drug oxamate) and HIF1A activity (using PX-478), completely abrogated the Mtb-induced migration of DCs to lymph nodes in both in vitro and in vivo models. Furthermore, we utilized a mouse model of BCG, which allowed us to observe that reduced migratory activity of DCs exposed to an HIF1A inhibitor translated into a lower number of CD4<sup>+</sup>-IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells specific for Mtb in the early post-immunization stages. This indicates that HIF1A activity is also crucial for the migration of BCG-infected DCs to lymph nodes and, potentially, for promoting the adaptive immune response.

Interestingly, we found that monocyte-derived DCs from TB patients exhibited a deficiency in glycolytic activation and migratory capacity in response to Mtb. Despite this, the precursors of these DCs, particularly CD16<sup>+</sup> monocyte populations, exhibited a high glycolytic capacity compared to monocytes derived from healthy individuals. In this sense, our results indicate that this exacerbated glycolysis depends on the presence of immunoglobulin G in the plasma of tuberculosis patients.

Taken together, these findings suggest that the highly glycolytic state of circulating monocytes in TB patients renders them refractory to the generation of migratory DCs, which may explain the delay in the migration of these cells during the course of the disease and open new pathways for the rational design of therapeutic strategies targeting host molecules to control TB.

**KEYWORDS:** DENDRITIC CELLS - GLYCOLYSIS - HIF1A - MIGRATION - MONOCYTES – TUBERCULOSIS.



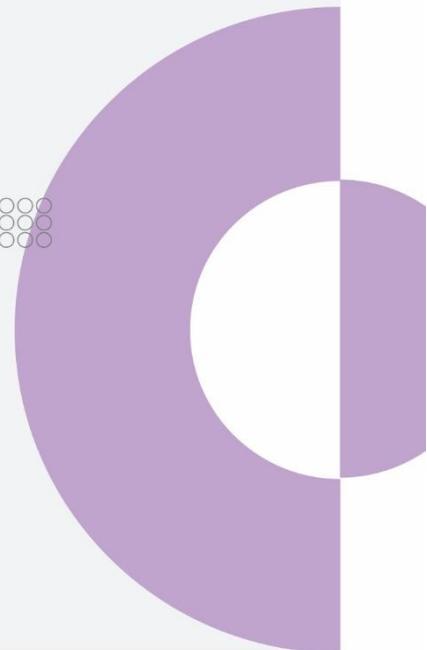
Lic. Mariano Nicolás Maio

# Alteraciones del metabolismo de las células dendríticas en la infección con *Mycobacterium tuberculosis*

*Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencia y tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes*

Directora de tesis: Dra. Luciana Balboa  
Consejero de estudios: Dr. Mariano N. Belaich

Lugar de trabajo: Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET- Academia Nacional de Medicina) – Laboratorio de Inmunología de Enfermedades Respiratorias Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida (UBA-CONICET).



BUENOS AIRES, 2025







### TRABAJOS PUBLICADOS

Parte de los resultados expuestos en el presente trabajo han sido publicados en revistas científicas y presentados en reuniones científicas tal como se detalla a continuación:

#### Trabajo publicado (con revisión de pares)

1. **Mariano Maio et al., (2024)**; "Elevated glycolytic metabolism of monocytes limits the generation of HIF1A-driven migratory dendritic cells in tuberculosis". **eLife**. <https://doi.org/10.7554/eLife.89319.4>

#### Trabajos presentados en reuniones científicas

1. **Mariano Maio et al., (2024)**; "Plasma from pulmonary tuberculosis patients impacts on monocyte metabolism determining their ability to generate migratory dendritic cells". 14<sup>TH</sup> Latin American and Caribbean Congress of Immunology. Lugar de realización: Buenos Aires, Argentina.
2. **Mariano Maio et al., (2023)**; "The inhibition of hif-1 $\alpha$  limits the migration of dendritic cells to lymph nodes in bcg-vaccinated mice". LXXI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Lugar de realización: San Luis, Argentina.
3. **Mariano Maio et al., (2023)**; "The inhibition of hif-1 $\alpha$  limits the migration of dendritic cells to lymph nodes in BCG-vaccinated mice". XI Meeting of the Latin American Society of Tuberculosis and other Mycobacteriosis. Lugar de realización: Bucaramanga, Colombia.
4. **Mariano Maio et al., (2022)**; "The glycolytic status of monocytes during tuberculosis limits the glycolysis-powered migratory capacity of dendritic cells in response to *Mycobacterium Tuberculosis*". LXVII reunión anual de la Sociedad Argentina De Investigación Clínica (SAIC), LXX reunión anual de la Sociedad Argentina De Inmunología (SAI) & 3rd French-Argentine Immunology Congress (FAIC), reunion anual 2022 de la Sociedad Argentina De Fisiología (SAFIS). Presentación premio SATZ. Lugar de realización: Mar del plata, Argentina.
5. **Mariano Maio et al., (2022)**; "HIF1 $\alpha$ -mediated glycolysis promotes the migratory capacity of dendritic cells activated by *Mycobacterium tuberculosis*". Collaboration for TB Vaccine Discovery (CTVD) Annual Meeting. Bill & Melinda Gates Foundation. Lugar de realización: Seattle, USA.
6. **Mariano Maio et al., (2022)**; "HIF1 $\alpha$ -mediated glycolysis promotes the migratory capacity of dendritic cells in tuberculosis". XLVI Congress of the Brazilian Society of Immunology IMMUNOMETABOLISM 2022. Lugar de realización: Sao Paulo, Brasil.
7. **Mariano Maio et al., (2021)**; "*Mycobacterium Tuberculosis* triggers the glycolytic pathway in dendritic cells through TLR2 ligation". LXIX Reunión Anual Sociedad Argentina de Inmunología. Lugar de realización: Virtual

## Trabajos publicados

8. **Mariano Maio et al., (2021)**; "Metabolic pathways involvement in dendritic cells activation induced by *Mycobacterium Tuberculosis*". X Meeting of the Latin American Society of Tuberculosis and other Mycobacteriosis. Lugar de realización: Virtual
9. **Mariano Maio et al., (2019)**; "Metabolic pathways involvement in dendritic cells activation induced by *Mycobacterium Tuberculosis*". LVII Reunión Anual Sociedad Argentina de Inmunología. Lugar de realización: Tucumán, Argentina

## Reconocimientos y distinciones

1. **Premio Alejandro A. Raimondi: Mejor trabajo en Tisiología, otorgado por la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.** Buenos Aires, Argentina. Marzo, 2023. Título del trabajo: "La glicólisis inducida por HIF-1 $\alpha$  mejora la capacidad migratoria de las células dendríticas en la tuberculosis". Mariano Maio, et al. (2023).
2. **Beca UNUBIOLAC: 4to Curso de Inmunidad Innata en Salud y Enfermedades Infecciosa.** Aguascalientes, México. Octubre, 2022.

### AGRADECIMIENTOS

Durante mi tesina de licenciatura escribí mis agradecimientos como “suerte”. La suerte de haber estudiado en la Universidad Nacional de Quilmes y de contar con todas esas personas que me acompañaron durante la carrera. Quiero escribir los agradecimientos de esta tesis como “elecciones”. Porque creo llamarlo “suerte” es injusto para todas esas personas que consistentemente tomaron la elección de “estar”.

Quiero agradecerle primero a Luciana por tomar la elección de hacer ciencia en Argentina y de enseñarme durante todos estos años. Una increíble persona y científica. Comprensiva, atenta, y vibrante de pasión. Gracias por guiarme y haberme dado la elección de compartir estos últimos 6 años.

A José Luis, por elegir enseñarme durante mis primeros momentos en el laboratorio y mostrarme lo divertido que es hacer ciencia pipeteando de a dos.

A Joa, por haber elegido ser mi amiga y compañera. Por acompañarme y transitar conmigo toda esta etapa. Gracias por haber sido exactamente lo que necesité, alguien con quien reír o un oído para desahogar.

A la banda de Inmuno I, una banda con una mística hermosa. Lo más lindo que me dejó esta etapa.

A Agus, por siempre tener las palabras correctas, por ser la que te segundea, por escucharme (a menos que esté atrás del vidrio de la cabina).

A el niño Alan, porque a pesar de ser tan distintos, siempre estuvimos conectados de alguna forma en la que hablar y compartir nuestras ansiedades era fácil.

A mis amiguitos del team pegamento, Cari y Florcita, porque al pensar en ustedes no puedo evitar sonreír. Gracias por alegrar un poquito todos mis días. Sin duda la razón por la que no existió la grieta en Inmuno I durante estos años.

A Fede, el primero en pasarme un mate y acercarse cuando todavía no conocía a nadie. Una persona hermosa, cercana, amable, lleno de amor. Gracias por regalarme tu amistad y ayudarme a crecer.

A Fer, el tipazo definitivo. Gracias por siempre estar, por dar una mano cuando se necesita, para segundear cualquier salida y por ser tan cercano.

A Marine, Joss, Yas y Jor, que, si bien compartimos menos tiempo juntos, son personas muy lindas y clave de toda esa mística que envuelve a Inmuno I.

## **Agradecimientos**

A Pau, Vero y Gaby, porque sin duda Inmuno I es lo que es gracias a su cercanía con los becarios, a sus ganas de crecer y su amor por la ciencia.

A los becarios del INBIRS, por recibirnos con el corazón abierto durante estos últimos meses y hacernos sentir como en casa.

A todos mis amigos por fuera del laboratorio. Gracias por haber elegido compartir conmigo la vida. Por escuchar, por reír, por crecer juntos.

A todos aquellos que hacen y forman la ciencia argentina. Ejemplos de resiliencia y excelencia. Orgulloso de haberme formado en mi país y de poder contribuir al conocimiento.

Por último, a mi familia, a mi mamá y papá, Luchi y Chessen. La mejor de mis "suertes" y si pudiera elegirlo, la más fácil de mis elecciones.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMEN</b> .....  | 1  |
| <b>SUMMARY</b> .....  | 3  |
| <b>TRABAJOS PUBLICADOS</b> .....  | 7  |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....  | 9  |
| <b>ÍNDICE</b> .....   | 11 |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....  | 14 |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....   | 16 |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....   | 17 |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | 20 |
| <b>Características epidemiológicas de la TB</b> .....   | 20 |
| <b>Inmunología de la TB</b> .....   | 23 |
| <i>Inmunidad innata durante la infección con Mtb</i> .....  | 23 |
| <i>Monocitos</i> .....  | 25 |
| <i>Células dendríticas (DCs) e inicio de la respuesta inmune adaptativa</i> .....   | 26 |
| <i>La infección con Mtb altera la funcionalidad de las DCs</i> .....  | 27 |
| <b>Inmunometabolismo: las vías metabólicas determinan la funcionalidad de las células inmunes</b> .....                           | 30 |
| <b>El factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1A) orquesta la reprogramación metabólica de las células inmunes</b> .....          | 31 |
| <b>Inmunometabolismo en DCs</b> .....   | 33 |
| <i>Perfil metabólico durante la diferenciación de monocitos a DCs (Mo-DCs)</i> .....  | 33 |
| <i>Rearreglos metabólicos que sufren las DCs inmunogénicas frente a un estímulo</i>   | 35 |
| <i>La unión a distintos PRRs gatilla un metabolismo diferencial en Mo-DCs inmunogénicas en etapas tardías de maduración</i> ..... | 36 |

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Regulación metabólica de las DCs tolerogénicas</i> .....   | 37        |
| <b>HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO GENERAL</b> .....  | <b>39</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | <b>42</b> |
| <b>Capítulo I</b> .....   | <b>42</b> |
| <i>Reactivos químicos</i> .....   | 42        |
| <i>Cepa de M. tuberculosis empleada</i> .....   | 42        |
| <i>Animales</i> .....   | 43        |
| <i>Preparación de DCs derivadas de monocitos humanos</i> .....  | 43        |
| <i>Muestras de pacientes con TB</i> .....   | 44        |
| <i>Estimulación de las DCs</i> .....  | 45        |
| <i>Tratamientos de las DCs</i> .....  | 45        |
| <i>Determinación de concentraciones de metabolitos</i> .....  | 46        |
| <i>Ensayos de PCR en tiempo real</i> .....  | 46        |
| <i>Caracterización fenotípica por citometría de flujo</i> .....   | 47        |
| <i>Determinación de la producción de citoquinas</i> .....   | 47        |
| <i>Ensayo de activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup></i> .....   | 48        |
| <i>Determinación de la capacidad de quimiotaxis de las DCs en respuesta a CCL21</i><br>.....                          | 48        |
| <i>Ensayo de migración 3D en matrices</i> .....   | 49        |
| <i>Ensayo de migración in vivo</i> .....  | 49        |
| <i>Estimación de la respiración celular mediante oximetría con el analizador de flujo extracelular Seahorse</i> ..... | 50        |
| <i>Evaluación del rol de los TLRs</i> .....   | 51        |
| <i>Evaluación del impacto de la modulación de HIF-1A y de la actividad de glicolítica de las DCs</i> .....            | 51        |
| <i>Determinación del metabolismo de las DCs por el método SCENITH</i> .....   | 51        |
| <i>Determinación de masa mitocondrial por citometría de flujo</i> .....   | 52        |
| <i>Análisis de la morfología mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión</i> .....                        | 52        |
| <i>Análisis de enriquecimiento de monocitos humanos</i> .....   | 52        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Capítulo II.....</b>  | <b>53</b> |
| <i>Cepa vacunal BCG.....</i>   | 53        |
| <i>Preparación de DCs derivadas de médula ósea (BMDC).....</i>   | 53        |
| <i>Transferencia adoptiva de BMDC a ratones.....</i>   | 53        |
| <i>Determinación de células T productoras de IFN-<math>\gamma</math>.....</i>  | 53        |
| <b>Capítulo III.....</b>   | <b>54</b> |
| <i>Generación de pools de plasma.....</i>  | 54        |
| <i>Tratamiento de monocitos .....</i>  | 54        |
| <b>Análisis estadístico.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>Capítulo I: estudio de las alteraciones metabólicas que sufren las Mo-DCs durante la infección con Mtb.....</b>   | <b>57</b> |
| <i>Mtb afecta al metabolismo de las DCs humanas derivadas de monocitos .....</i>   | 57        |
| <i>La exposición a Mtb induce preferencialmente un metabolismo glicolítico en las DCs.....</i>   | 59        |
| <i>Mtb activa la vía glicolítica a través de su interacción con TLR2.....</i>  | 62        |
| <i>HIF1A es necesario para la maduración de las DCs tras la estimulación con iMtb, pero no para la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.....</i> | 65        |
| <i>La glicólisis mediada por HIF1A promueve la motilidad de las DCs tras la estimulación con iMtb .....</i>  | 69        |
| <i>La estabilización de HIF1A promueve la migración de DCs tolerogénicas y DCs derivadas de monocitos de pacientes con TB.....</i>                           | 73        |
| <i>Los monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB muestran una mayor capacidad glicolítica .....</i>   | 77        |
| <i>La activación de HIF1A en monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB da lugar a DCs diferenciadas con escasa capacidad de migración .....</i>         | 81        |
| <i>Conclusiones parciales de la primera parte .....</i>  | 84        |
| <b>Capítulo II: impacto de la modulación del eje glicólisis/HIF1A en las DCs sobre el inicio de la respuesta adaptativa contra micobacterias.....</b>        | <b>84</b> |
| <i>La cepa vacunal BCG induce la vía glicolítica en BMDC.....</i>  | 84        |

|   |            |
|---|------------|
| <i>La glicólisis mediada por HIF1A promueve la migración de las BMDC a ganglios linfáticos</i> .....  | 87         |
| <i>La inhibición de la actividad de HIF1A en BMDC limita la aparición de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN-<math>\gamma</math>.</i> .....   | 88         |
| <i>Conclusiones parciales de la segunda parte.</i> .....  | 90         |
| <b>Capítulo III: estudio del mecanismo por los cuales la glicólisis exacerbada en los monocitos de pacientes con TB predispone a la generación de DCs con menor capacidad migratoria</b> .....                  | <b>90</b>  |
| <i>Caracterización metabólica del plasma de pacientes con TB y su impacto en la viabilidad celular</i> .....  | 90         |
| <i>El plasma tuberculoso induce la vía glicolítica en monocitos de dadores sanos.</i> 91  | 91         |
| <i>El plasma de pacientes con TB influencia el metabolismo de monocitos CD16<sup>+</sup> a través de la vía IgG – receptor Fc CD16 (Fc<math>\gamma</math>R11a)</i> .....  | 94         |
| <i>Conclusiones parciales de la tercera parte</i> .....   | 96         |
| .....   | 98         |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....  | <b>99</b>  |
| <i>Discusión de la primera parte: estudio de las alteraciones metabólicas que sufren las Mo-DCs durante la infección con Mtb</i> .....  | 99         |
| <i>Discusión de la segunda parte: impacto de la modulación del eje glicólisis/HIF1A en las DCs sobre el inicio de la respuesta adaptativa contra micobacterias.</i> .....                                       | 104        |
| <i>Discusión de la tercera parte: estudio del mecanismo por los cuales la glicólisis exacerbada en los monocitos de pacientes con TB predispone a la generación de DCs con menor capacidad migratoria</i> ..... | 108        |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....   | <b>113</b> |
| .....   | 114        |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>115</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. El espectro de la tuberculosis – desde la infección con Mycobacterium tuberculosis a una enfermedad activa. ....              | 22 |
| Figura 2. Los mecanismos de evasión/patogénicos de Mycobacterium tuberculosis modulan la funcionalidad de las células dendríticas. .... | 29 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 3. Principales rutas metabólicas involucradas en la regulación de las funciones efectoras de las células inmunes.....  | 31 |
| Figura 4. Mecanismo de regulación post-traduccional de HIF1A en células inmunes. ....   | 33 |
| Figura 5. Reprogramación metabólica a tiempos tempranos de la activación de las DCs. ....   | 36 |
| Figura 6. Resumen gráfico de la metodología implementada para el capítulo I.....  | 42 |
| Figura 7. Esquema representativo del perfil cinético de las mediciones de OCR y ECAR en un ensayo de tasa de producción de ATP en tiempo real. ....                                 | 50 |
| Figura 8. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb) reconfigura la red metabólica de las células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DCs). ....                                    | 58 |
| Figura 9. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb) desvía el metabolismo de las células hacia la glicólisis. ....  | 61 |
| Figura 10. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb) desencadena la glicólisis a través de de TLR2 en células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DCs).....                        | 64 |
| Figura 11. La unión de TLR2 gatilla la glicólisis en Mo-DCs. ....   | 64 |
| Figura 12. La actividad de HIF1A es necesaria para activar la vía glicolítica en células dendríticas (DCs) estimuladas con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> irradiado (iMtb). .... | 66 |
| Figura 13. HIF1A es necesario para adquirir un fenotipo maduro en Mo-DCs. ....  | 67 |
| Figura 14. La actividad de HIF1A en células dendríticas no afecta la polarización de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> . ....   | 69 |
| Figura 15. La glicólisis es necesaria para desencadenar la actividad migratoria en células dendríticas (DCs) estimuladas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . ....               | 71 |
| Figura 16. La glicólisis es necesaria para desencadenar la actividad migratoria en células dendríticas (DCs) estimuladas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . ....               | 73 |
| Figura 17. Perfil de las células dendríticas (DCs) tolerogénicas inducidas por dexametasona (Dx). ....  | 74 |
| Figura 18. La estabilización de HIF1A restaura el metabolismo glicolítico en células dendríticas tolerogénicas (Dx-DCs).....  | 75 |
| Figura 19. La estabilización de HIF1A promueve la migración en células dendríticas tolerogénicas (Dx-DCs). ....   | 76 |
| Figura 20. La estabilización de HIF1A promueve la migración en células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DCs) de pacientes con tuberculosis (TB).....                          | 77 |
| Figura 21. Los monocitos CD16 <sup>+</sup> de pacientes con tuberculosis (TB) muestran una mayor capacidad glicolítica. ....  | 79 |
| Figura 22. Asociación entre el estado glicolítico basal de los monocitos y la gravedad de la enfermedad pulmonar. ....  | 80 |
| Figura 23. Los monocitos de pacientes con tuberculosis (TB) presentan un aumento en la expresión de HIF1A.....  | 81 |
| Figura 24. La activación prematura de HIF1A en monocitos da lugar a células dendríticas (DCs) con escasa capacidad de migración. ....   | 82 |
| Figura 25. Resumen gráfico del primer capítulo.....   | 83 |
| Figura 26. La cepa vacunal BCG induce la glicólisis en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de forma HIF1A dependiente.....  | 86 |
| Figura 27. La actividad de HIF1A es necesaria para la migración eficiente de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) a ganglios linfáticos.....                         | 87 |
| Figura 28. La inhibición de HIF1A en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) limita la generación de linfocitos CD4 <sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ .....     | 89 |
| Figura 29. Resumen gráfico del capítulo II.....   | 89 |
| Figura 30. Caracterización del pool de plasma de pacientes con tuberculosis (TB). ....  | 91 |
| Figura 31. El plasma de pacientes con tuberculosis (pTB) induce la glicólisis mediada por HIF1A en monocitos de dadores sanos.....  | 92 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 32. El plasma de pacientes con tuberculosis (TB) aumenta la capacidad glicolítica en las poblaciones de monocitos CD16 <sup>+</sup> .....       | 93 |
| Figura 33. La exposición de monocitos al plasma de pacientes con tuberculosis (TB) genera células dendríticas (DCs) con baja capacidad migratoria..... | 94 |
| Figura 34. El efecto del plasma tuberculoso es dependiente de la IgG. ....   | 95 |
| Figura 35. Resumen gráfico del capítulo III.....   | 96 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes con TB ..... | 44 |
| Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados.....                             | 47 |

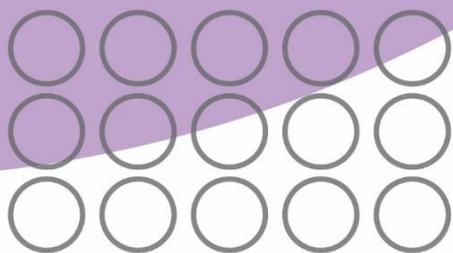
## ABREVIATURAS

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Ácido desoxirribonucleico                                    | <b>ADN</b>                     |
| Ácidos ribonucleicos   | <b>ARN</b>                     |
| ADN complementario doble cadena                              | <b>ADNc</b>                    |
| Análisis de enriquecimiento de set de genes                  | <b>GSEA</b>                    |
| Anticuerpos monoclonales neutralizantes                      | <b>mAb</b>                     |
| Antígenos  | <b>Ags</b>                     |
| ARN mensajero  | <b>ARNm</b>                    |
| Bacilo Calmette-Guérin                                       | <b>BCG</b>                     |
| Bacilos ácido-alcohol resistentes                            | <b>BAAR</b>                    |
| Cadena de transporte de electrones                           | <b>ETC</b>                     |
| <i>Cell trace violet</i>                                     | <b>CTV</b>                     |
| Células dendríticas (del inglés, <i>dendritic cells</i> )    | <b>DCs</b>                     |
| Células dendríticas derivadas de médula ósea                 | <b>BMDC</b>                    |
| Células dendríticas derivadas de monocitos                   | <b>Mo-DCs</b>                  |
| Células dendríticas tolerogénicas inducidas por dexametasona | <b>Dx-DCs</b>                  |
| Células mieloides supresoras                                 | <b>MSC</b>                     |
| Cepa $\gamma$ -irradiada H37Rv                               | <b>iMtb</b>                    |
| Ciclo de los ácidos tricarbóxicos                            | <b>TCA</b>                     |
| Complejo mayor de histocompatibilidad                        | <b>MHC</b>                     |
| Concentrados leucocitarios                                   | <b>Buffy coats</b>             |
| Derivado proteico purificado                                 | <b>PPD</b>                     |
| Dexametasona   | <b>Dx</b>                      |
| Dimetiloxalilglicina   | <b>DMOG</b>                    |
| Elemento de respuesta a hipoxia                              | <b>HRE</b>                     |
| Enfermedad por coronavirus                                   | <b>COVID-19</b>                |
| Ensayo de liberación de IFN- $\gamma$                        | <b>IGRA</b>                    |
| Equinomicina   | <b>Ech</b>                     |
| Especies reactivas de oxígeno                                | <b>ROS</b>                     |
| Etambutol  | <b>E</b>                       |
| Factor de elongación de la traducción eucariota 1 alfa 1     | <b>EeF1A1</b>                  |
| Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos  | <b>GM-CSF</b>                  |
| Factor inducible por hipoxia 1 alfa                          | <b>HIF1A</b>                   |
| Factor nuclear kappa B                                       | <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> |
| Factores de transcripción inducibles por hipoxia             | <b>HIF</b>                     |
| <i>Fluorescence minus one</i>                                | <b>FMO</b>                     |
| Fosforilación oxidativa                                      | <b>OXPHOS</b>                  |
| Glicolípidos fenólicos                                       | <b>PGL</b>                     |

## Abreviaturas

|  |               |
|--|---------------|
| Indoleamina 2, 3-dioxigenasa                       | <b>IDO</b>    |
| Infección latente de TB                            | <b>LTBI</b>   |
| Inmunoglobulinas                                   | <b>Ig</b>     |
| Isoniacida   | <b>H</b>      |
| Lactato deshidrogenasa A                           | <b>LDHA</b>   |
| Lectinas de tipo C                                 | <b>CLR</b>    |
| Lipoarabinomanano recubierto de manosa             | <b>ManLAM</b> |
| Lipopolisacárido                                   | <b>LPS</b>    |
| Media con su error estándar                        | <b>SEM</b>    |
| Mediana de la intensidad de fluorescencia          | <b>IMF</b>    |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                  | <b>Mtb</b>    |
| Organización mundial de la salud                   | <b>OMS</b>    |
| Oxamato  | <b>OX</b>     |
| Oxidación de los ácidos grasos                     | <b>FAO</b>    |
| Patrones moleculares asociados a patógenos         | <b>PAMPs</b>  |
| Peptidoglicano                                     | <b>PTG</b>    |
| Pirazinamida                                       | <b>Z</b>      |
| Plasma de pacientes con tuberculosis               | <b>pTB</b>    |
| Plasma de pacientes de donadores sanos             | <b>pHS</b>    |
| Protil hidrolasas dependientes de oxígeno          | <b>PHD</b>    |
| Proteína fluorescente roja                         | <b>RFP</b>    |
| Proteína von Hippel-Lindau                         | <b>VHL</b>    |
| Prueba cutánea de la tuberculosis                  | <b>TST</b>    |
| Puntaje de enriquecimiento normalizado             | <b>NES</b>    |
| PX-478   | <b>PX</b>     |
| Receptores de reconocimiento de patrones           | <b>PPRs</b>   |
| Receptores de tipo NOD                             | <b>NLR</b>    |
| Receptores tipo Toll                               | <b>TLR</b>    |
| Rifampicina  | <b>R</b>      |
| Ruta de las pentosas fosfato                       | <b>PPP</b>    |
| Síntesis de ácidos grasos                          | <b>FAS</b>    |
| Suero fetal bovino                                 | <b>SFB</b>    |
| Tasa de acidificación extracelular                 | <b>ECAR</b>   |
| Tasa de consumo de oxígeno                         | <b>OCR</b>    |
| Tasa de eflujo de protones                         | <b>PER</b>    |
| Traductor de señal y activador de la transcripción | <b>STAT</b>   |
| Transportador de glucosa 1                         | <b>GLUT1</b>  |
| Tuberculosis                                       | <b>TB</b>     |
| Virus de la inmunodeficiencia humana               | <b>VIH</b>    |

# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### Características epidemiológicas de la TB

La TB es una enfermedad prevenible y usualmente curable. Sin embargo, en 2023, la TB volvió a ser la principal causa de muerte por un único agente infeccioso, luego de ser superada por la enfermedad por coronavirus (COVID-19) durante los años anteriores y, causó el doble de muertes que el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Más de 10 millones de personas continúan enfermándose de TB cada año en todo el mundo. Durante 2023, 30 países con altos índices de TB reunieron el 87% de todos los casos, con el 57% concentrado en cinco países: India (26%), Indonesia (10%), China (7%), Filipinas (7%) y Pakistán (6,3%). Al mismo tiempo, durante el mismo año se reportó que el 55% de las personas que desarrolló TB fueron hombres, 33% mujeres y 12% fueron niños (0-14 años) (WHO, 2024).

En Argentina, los casos notificados en el 2023 fueron de 14.914, lo cual representa una tasa de notificación de 32 cada 100.000 habitantes y un 11% de incremento respecto del 2022. De la totalidad de los casos reportados, el 59,5% fue en hombres y el 7,9% en niños menores de 15 años. Además, de los casos notificados, 379 presentaron resistencia a rifampicina o a múltiples drogas utilizadas durante el tratamiento. Del total de casos, 733 resultaron en defunciones, siendo el 10,6% asociadas al VIH (WHO, 2024). El agente causal de la TB, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) puede infectar diversas partes del cuerpo, aunque comúnmente afecta los pulmones. La manifestación de la enfermedad fuera de los pulmones se conoce como TB extrapulmonar y se presenta principalmente en adultos jóvenes y personas inmunocomprometidas (Khusro et al., 2016). Aunque la TB pulmonar es la forma más frecuente, entre el 10 y el 15% de los casos son extrapulmonares. En nuestro país, en 2023 un 90,8% de los casos de TB notificados presentaron una localización pulmonar, mientras que solo un 6,1% presentó TB extrapulmonar. Entre las formas extrapulmonares, la TB pleural es la forma más habitual en niños mayores, adolescentes y adultos jóvenes, afectando hasta un 10% de los hombres y un poco menos a las mujeres (L. A. Cohen & Light, 2015).

Generalmente, las vías aéreas son la principal vía de infección. Cuando una persona con TB activa expulsa microgotas de saliva o mucosidad al hablar o estornudar, estas pueden ser inhaladas por otra persona. La exposición a Mtb lleva a dos posibles escenarios: la eliminación o la persistencia del patógeno. En el primer caso, el patógeno es eliminado ya sea por la respuesta inmune innata (en este caso la prueba cutánea de la TB (TST) o el ensayo de liberación de IFN- $\gamma$  (IGRA) dan negativos) o debido a la respuesta inmune adaptativa (TST o IGRA pueden ser positivos o negativos dependiendo de si se desarrolló una respuesta de memoria). Si el patógeno

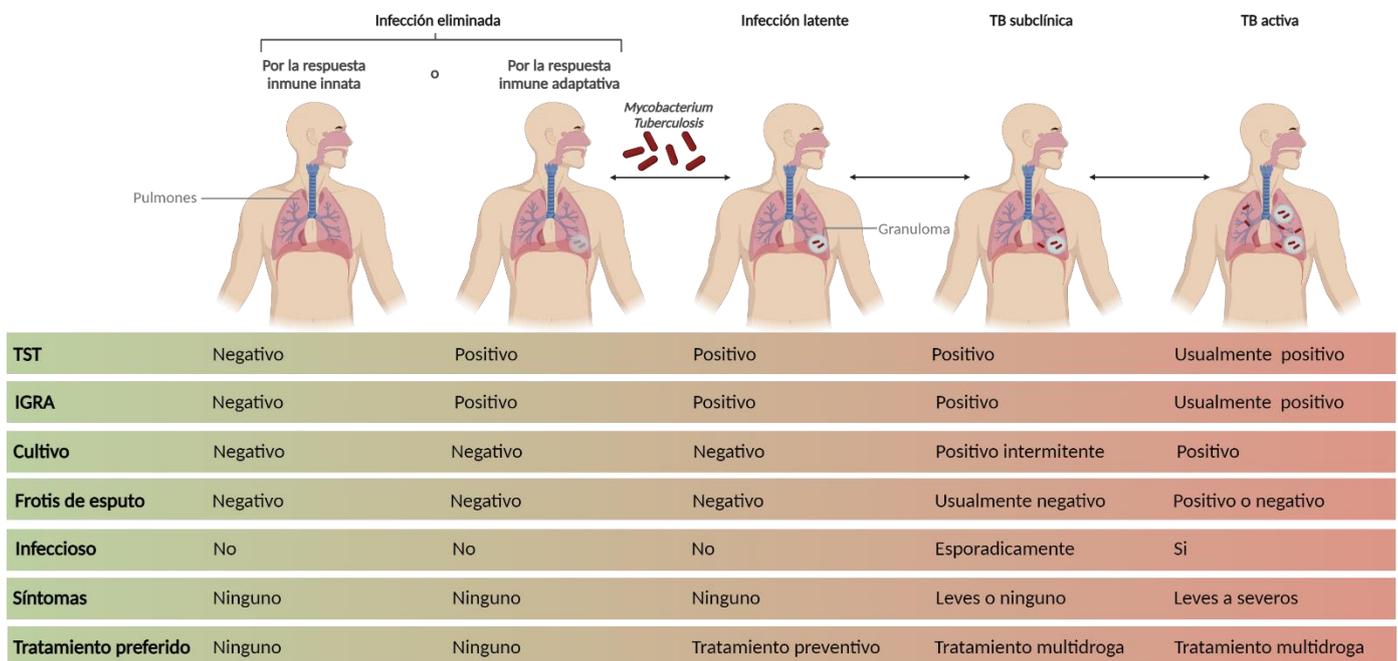
no es eliminado, la bacteria puede persistir en un estado quiescente, donde la persona cursa una infección latente, y tienen resultados TST o IGRA positivos. Si bien en la clínica los pacientes son categorizados según si tienen una infección latente de TB (LTBI) o una TB activa, actualmente se reconoce un espectro más amplio estados de la enfermedad tuberculosa (**Figura 1**) (Pai et al., 2016). Recientemente se ha descrito un estadio de la TB denominado subclínico como aquella enfermedad debida a bacterias Mtb viables que no causa síntomas clínicos relacionados con la TB, pero que causa otras anomalías que pueden detectarse mediante los ensayos radiológicos o microbiológicos existentes (**Figura 1**). Teniendo en cuenta que hay estudios que demuestran el potencial infectivo de pacientes con TB subclínica, este grupo podría ser un blanco estratégico en los regímenes terapéuticos para el control de la enfermedad (Kendall et al., 2021).

La TB también puede surgir por reactivación de una infección latente o por reinfección. Se estima que alrededor de un cuarto de la población mundial ha sido o está infectado por Mtb, pero la mayoría no desarrolla la enfermedad (WHO, 2024). De las personas con infección latente, entre un 5 y un 15% puede progresar a TB activa durante los primeros años tras la infección, mientras que la mayoría permanecerá en estado latente con Mtb viable. La TB activa puede desarrollarse rápidamente, en los primeros 18 meses después de la infección, o tras muchos años de latencia. La reactivación tardía a menudo se relaciona con inmunosupresión por otras enfermedades o el envejecimiento, mientras que la progresión temprana podría ser resultado de una respuesta inmune inicial ineficaz (Y. Luo et al., 2019).

La infección latente se diagnostica mediante pruebas inmunológicas, como la TST o el ensayo IGRA, sin signos clínicos o síntomas de enfermedad, y con una radiografía de tórax normal (**Figura 1**). Este estado refleja un equilibrio en el que el hospedero controla la infección, pero no logra erradicar completamente la bacteria. Las personas con TB latente son el principal reservorio en términos de capacidad de transmisión, ya que tienen un riesgo de reactivación que puede llevar a la TB activa y su posterior propagación a personas cercanas (P. L. Lin & Flynn, 2010).

La mayoría de los casos de TB activa en regiones de baja prevalencia se deben a la reactivación de infecciones previas (47-87%) (Barnes et al., 1999; Jasmer et al., 1999; Weis et al., 2002), mientras que, en áreas altamente endémicas, como Sudamérica, África y Asia del Este, predominan las infecciones recientes o primarias (Verver et al., 2004). Se estima que el riesgo de reactivación a lo largo de la vida es del 10%, pero condiciones que deterioran la inmunidad, como la infección por VIH, pueden aumentar este riesgo hasta un 10% anual (Sia & Rengarajan, 2019). Además, se calcula que

una persona con TB activa puede contagiar a un promedio de 10 personas al año, lo que contribuye a la perpetuación de la epidemia global (Ernst, 2018).



**Figura 1. El espectro de la tuberculosis – desde la infección con *Mycobacterium tuberculosis* a una enfermedad activa.**

A pesar de que la enfermedad tuberculosa puede ser vista como un continuo dinámico desde la infección con Mtb a una enfermedad infecciosa, los pacientes pueden ser categorizados como enfermos latentes o con TB activa por simplicidad clínica. Los individuos pueden avanzar o retroceder en el espectro dependiendo de cambios en la inmunidad del hospedador y comorbilidades.

Tras su implementación en 1921, la vacuna BCG sigue siendo la más utilizada hasta hoy, a pesar de sus limitaciones y su eficacia muy variable. La BCG es una vacuna atenuada derivada de *M. bovis* obtenida tras 13 años de pasaje *in vitro* continuo. Proporciona una protección eficaz contra la TB en infantes, pero falla en la protección contra la TB pulmonar en adultos. La protección que ofrece la BCG disminuye con el tiempo (aproximadamente entre 10 y 20 años después de la inmunización), momento en el que la persona corre el máximo riesgo de exposición a la enfermedad (Heimbeck, 1936). Si bien en la última década hubo importantes avances en el campo de la investigación de vacunas contra la TB, la búsqueda de una vacuna superadora continúa debido a la falta de conocimientos sobre el rol de la inmunidad protectora contra el bacilo.

Adicionalmente, el acceso al tratamiento es fundamental para controlar la transmisión de la TB, ya que su aparición, ya sea por infección reciente o reactivación, implica la diseminación del patógeno. La demora en

el diagnóstico, especialmente en países con escasos recursos, es un factor que agrava esta situación endémica. Sin tratamiento, la tasa de muerte de la TB es alta. Los últimos lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyen fuertes recomendaciones de un régimen de 6 meses de isoniacida (H), rifampicina (R), etambutol (E) y pirazinamida (Z) para personas con TB sensible a drogas (tanto pulmonar como extrapulmonar): las 4 drogas durante los primeros 2 meses, seguidos de H y R por los restantes 4 meses (WHO, 2024). Estos plazos extensos de tratamiento fomentan una baja adherencia al tratamiento. En ese sentido, en Argentina, se ha reportado un 52,5% de readmisiones tras abandonos de tratamiento en 2023 (Argentina, 2024). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas estrategias que puedan acortar los tiempos de las terapias antibióticas representa una necesidad imperiosa.

## Inmunología de la TB

### Inmunidad innata durante la infección con Mtb

El primer encuentro entre el hospedador y el patógeno en la TB se produce en la interfaz entre las células inmunes innatas y Mtb. Si bien la inmunidad innata es fundamental para las respuestas anti micobacterianas tempranas, también es importante para la progresión de la infección y el control a largo plazo de Mtb al iniciar y modular continuamente la respuesta inmune adaptativa y regular la inflamación. Sin embargo, las células inmunes innatas suelen ser nichos para la replicación bacteriana, y Mtb utiliza diversas estrategias que alteran la respuesta inmune innata para establecer una infección crónica.

Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que presenta Mtb se reconocen a través de una variedad de receptores que median la captación bacteriana. Entre estos receptores se encuentran: lectinas de tipo C (CLR) (ej., receptores de manosa, DC-SIGN, Dectin-1, Dectin-2, Mincle), receptores del complemento (ej., receptor 3 del complemento), colectinas (ej., proteínas surfactantes A y D, lectina de unión a manosa), receptores *scavenger* (ej., MARCO, SR-A1, CD36, SR-B1), receptores Fc (ej., FcγR), receptores de membrana anclados a glicofosfatidilinositol (ej., CD14) y receptores tipo Toll (TLR, ej., TLR-2, TLR-4, TLR-9) (Jo et al., 2007; Philips & Ernst, 2012; Van Crevel et al., 2011). El lipoarabinomano manosilado, los manósidos de fosfatidil-inositol, los dimicocerosatos de ftiocerol, los glicolípidos fenólicos (PGL), el dimicolato de trehalosa, el peptidoglicano y otros componentes micobacterianos son reconocidos por una serie de receptores intracelulares o de superficie celular que median la fagocitosis y/o las defensas antimicrobianas. El ácido desoxirribonucleico (ADN) de Mtb (Manzanillo et al., 2012; Watson et al., 2012) o los segundos mensajeros bacterianos como el di adenosín monofosfato cíclico (Dey et al., 2015), pueden ser reconocidos por

receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) citosólicos, como cGAS y STING (A. C. Collins et al., 2015; Watson et al., 2015), para inducir la producción de citoquinas y la autofagia. Además, los receptores de tipo NOD (NLR) son PRRs citosólicos que reconocen PAMPs de Mtb, como el dipéptido muramilo, para activar el inflammasoma. Para algunos receptores, existen redundancias funcionales debido a la unión promiscua de ligandos por diferentes receptores y a la amplia gama de ligandos que exhibe Mtb (Court et al., 2010). Sin embargo, este no es el caso para ciertos PRRs, donde su número y sus vías de señalización asociadas juegan un rol importante, no redundante, en la defensa del hospedador frente a Mtb.

Mientras que el reconocimiento de Mtb por parte del hospedador lleva a la activación de la inmunidad innata, este patógeno ha desarrollado estrategias para evadir la respuesta inmune innata mediada por PRRs. Se ha encontrado que la expresión de componentes que recubren Mtb específicos de cada cepa generan respuestas inmunes distintas (Reed et al., 2004; Sinsimer et al., 2008). Al mismo tiempo, Mtb es capaz de producir glicolípidos antagonistas de TLR2 que impiden el reconocimiento eficiente de Mtb por este receptor (Blanc et al., 2017). Y finalmente, Mtb puede interferir con la respuesta inmune innata a través de la síntesis de proteínas como, por ejemplo, la hidrolasa HIP1, cuya actividad disminuye la respuesta inflamatoria gatillada por el reconocimiento vía TLR2 en macrófagos y células dendríticas (DCs) (Madan-Lala et al., 2011, 2014; Naffin-Olivos et al., 2014; Rengarajan et al., 2008).

Los macrófagos son las primeras células inmunitarias que se encuentran con Mtb durante la infección y también representan el nicho replicativo primario de Mtb. El reconocimiento de Mtb por los macrófagos conduce a la fagocitosis y el secuestro de la bacteria en los fagosomas, que pueden erradicar a los patógenos internalizados mediante la fusión con los lisosomas y la consiguiente acidificación del fagolisosoma. Sin embargo, Mtb es capaz de sobrevivir y replicarse en el fagosoma inhibiendo la maduración fagosomal y la generación fagolisosomal a través de la síntesis de lípidos y su sistema de secreción ESX-1 y ESX-3 (Ehrt & Schnappinger, 2009; Philips & Ernst, 2012). Además, los perfiles transcripcionales de bacterias intrafagosomales indicaron que Mtb despliega estrategias para contrarrestar el entorno fagosomal nitrosativo, oxidativo, hipóxico y pobre en nutrientes mediante la expresión de genes adaptados al estrés (Schnappinger et al., 2003), indicando que Mtb se ha adaptado a un estilo de vida dentro del macrófago y emplea muchas estrategias para sobrevivir dentro de estas células.

La secreción de citoquinas y quemoquinas al principio de la infección recluta fagocitos adicionales al lugar de la infección. La secreción temprana de quimioattractantes puede atribuirse tanto a los macrófagos alveolares infectados como a las células epiteliales pulmonares (Y. Lin et al., 1998;

Nouailles et al., 2014; Wickremasinghe et al., 1999). Dicha secreción de quimioattractantes recluta al foco infeccioso monocitos y granulocitos que ejercen presión inmunitaria sobre Mtb y es crucial para el inicio de respuestas inmunes adaptativas, pero también puede promover la transmisión y diseminación de entre células de Mtb.

### Monocitos

Los monocitos son leucocitos derivados de la médula ósea que circulan por la sangre y, bajo ciertas condiciones, pueden diferenciarse en macrófagos y DCs derivadas de monocitos (Mo-DCs) que rigen la respuesta inmune innata y adaptativa (Guilliams et al., 2014). Estas células son de naturaleza heterogénea y presentan una gran plasticidad. La identificación de las poblaciones de monocitos en humanos se basa en la expresión relativa de CD14 (correceptor de TLR4 y mediador de la señalización del lipopolisacárido (LPS) y CD16 (receptor Fc gamma IIIa). El fenotipado por citometría de flujo ha identificado tres poblaciones diferentes de monocitos: monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) y no clásicos (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Las tres subpoblaciones de monocitos son fenotípica y funcionalmente diferentes.

En condiciones fisiológicas, los monocitos clásicos constituyen aproximadamente el 80-95% de los monocitos circulantes. La mayoría de los monocitos clásicos son reclutados a tejidos periféricos donde se diferencian en células derivadas de monocitos o entran en reservorios de monocitos indiferenciados (A. A. Patel et al., 2017). Estas células tienen una alta capacidad fagocítica. Los monocitos intermedios comprenden alrededor del 2-8% de los monocitos circulantes. Esta población de monocitos muestra heterogeneidad fenotípica y funcional tanto en ratones como en humanos (Mildner et al., 2017; Villani et al., 2017), reuniendo propiedades de los clásicos y los no clásicos. Los monocitos no clásicos representan entre el 2 y el 11% de los monocitos circulantes. Son móviles por naturaleza y patrullan el endotelio monitoreando la integridad de la vasculatura (Carlin et al., 2013). Se ha demostrado que esta población de monocitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> detecta ácidos nucleicos virales a través de los receptores TLR7 y TLR8 (Cros et al., 2010).

Está reportado que los monocitos CD16<sup>+</sup> se expanden en la infección por TB (Castaño et al., 2011) y que el aumento de esta subpoblación correlaciona con la gravedad de la enfermedad. En línea con ello, la expansión de los monocitos CD16<sup>+</sup> se revierte con el tratamiento antituberculoso (Sánchez et al., 2006). Cuando se comparan con los monocitos CD16<sup>+</sup>, los monocitos CD16<sup>-</sup> (clásicos) confieren respuestas inmunes antimicobacterianas durante la infección por TB, como una mayor migración en respuesta a derivados micobacterianos, una mayor producción

de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un mayor índice de migración hacia los pulmones. Se ha sugerido que la infiltración inmediata de esta población en el lugar de la infección y la producción de ROS tienen como resultado la reducción del crecimiento bacteriano. Por el contrario, los monocitos CD16<sup>+</sup> están implicados en la promoción de la resistencia bacteriana (Balboa et al., 2015), puesto que induce un nivel mínimo de estallido respiratorio y no responde en las primeras fases de la infección debido a la falta de receptores de quemoquinas (CCR2) necesarios para la migración de este subconjunto al lugar de la infección. Del mismo modo, la pérdida de HLA-DR representa una capacidad de presentación de antígeno (Ags) ineficaz que conduce al aumento de la gravedad de la enfermedad (Zulfiqar Malik et al., 2000).

Además, los monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB tienen una escasa capacidad para diferenciarse en DCs funcionales debido al alto nivel basal de p38 MAP quinasa (Balboa et al., 2013a). El deterioro de la diferenciación de monocitos a DCs y sus funciones como células presentadoras de Ags tras la infección con Mtb, resulta en una disminución de su capacidad para montar fuertes respuestas adaptativas contra este patógeno (Lugo-Villarino & Neyrolles, 2013).

### **Células dendríticas (DCs) e inicio de la respuesta inmune adaptativa**

Una función importante de la inmunidad innata durante la infección por Mtb es la activación de la respuesta inmune adaptativa. Las DCs son células presentadoras de Ags profesionales que inician la inmunidad adaptativa presentando Ags de Mtb en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés), moléculas coestimuladoras y citoquinas. Tras la infección por Mtb, las DCs maduran y migran a los ganglios linfáticos que drenan el pulmón, de forma dependiente del receptor CCR7 y sus correspondientes quemoquinas CCL19 y CCL21, para iniciar respuestas de células T específicas de Ags (Bhatt et al., 2004; Olmos et al., 2010; Wolf et al., 2008a). Además, la interleuquina (IL) 12, una citoquina secretada por células mieloides e importante para la inducción de respuestas de IFN- $\gamma$ , es necesaria para la migración de DCs durante la infección por Mtb (Khader et al., 2006). El inicio de la respuesta inmune adaptativa requiere del transporte de bacterias vivas a los ganglios linfáticos que drenan el tejido pulmonar (Wolf et al., 2007, 2008b), pero las células T Ags específicas pueden ser activadas tanto por las DCs migratorias infectadas como por las DCs residentes en los ganglios linfáticos no infectados. Sin embargo, la infección por Mtb altera la funcionalidad de las DCs resultando en una respuesta menos eficiente de las células T específicas de Ags. Inicialmente se propuso que la transferencia de Ags desde DCs infectadas a DCs no infectadas (*bystander*) beneficiaba al hospedador al evitar la presentación de Ags ineficiente por

parte de las DCs infectadas. Sin embargo, se demostró que al inhibir la secreción de Ags de Mtb mejoraba la presentación de Ags en el contexto de MHC de clase II en las propias DCs infectadas (Srivastava et al., 2016). Estos antecedentes destacan que la interacción eficaz entre las DCs y las células T depende de la función adecuada de la maquinaria de presentación de Ags, incluida la expresión del MHC, las moléculas coestimuladoras y las citoquinas tras la infección por Mtb, aspecto que puede complejizarse por la heterogeneidad entre las poblaciones involucradas.

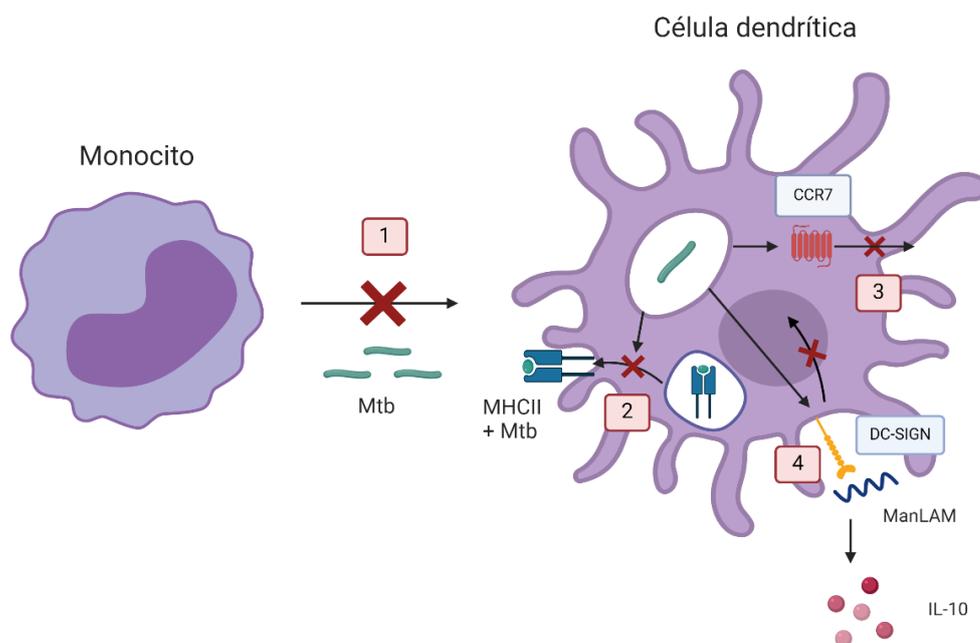
### La infección con Mtb altera la funcionalidad de las DCs

Aunque aún no contamos con correlatos fiables que den cuenta de la inmunidad protectora frente a Mtb, está ampliamente aceptado que las células Th1 contribuyen a la protección secretando IFN- $\gamma$  y promoviendo la actividad antimicobacteriana en los macrófagos (Schaible et al., 2015). Es importante destacar que la inducción de una fuerte respuesta inmune Th1 se basa en la generación de DCs inmunogénicas con fuertes propiedades migratorias (Cooper, 2009; Khader et al., 2006; Lai et al., 2018; Wolf et al., 2007). Se ha demostrado que Mtb interfiere con varias funciones de DCs, perjudicando así la inducción y el desarrollo de la inmunidad adaptativa (Chandra et al., 2022; Ernst, 2018; Plumlee et al., 2020) (**Figura 2**). En primera instancia, Mtb es capaz de escapar de alterar la diferenciación de monocitos a Mo-DCs llevando a una respuesta deficiente de las células T específicas contra Mtb (Balboa et al., 2010). Este resultado es relevante ya que los monocitos tienen un rol destacado en el reabastecimiento de DCs especialmente (o exclusivamente para algunos autores) en condiciones inflamatorias (Wacleche et al., 2018).

Además, Mtb dispone de varios componentes de la pared celular que pueden modular la respuesta inmune de las DCs. La pared celular de las micobacterias contiene varios glucoconjugados como peptidoglicano, arabinogalactano y glicolípidos. Algunos de estos glucoconjugados regulan la respuesta inmune del hospedador principalmente mediante su unión a los receptores CLR. Por ejemplo, el glicolípido micobacteriano Di-O-acil trehalosa promueve la secreción de IL-10 e indolamina 2, 3-dioxigenasa (IDO) y reduce la secreción de IL-12 y la expresión de moléculas coestimuladoras en las DCs, promoviendo la expansión de células T reguladoras FoxP3<sup>+</sup> (Magallanes-Puebla et al., 2018). Otro componente de la pared celular de Mtb, el lipoarabinomanano recubierto de manosa (ManLAM), regula la activación de las DCs. El tratamiento con ManLAM de Mo-DCs humanas inhibe la maduración de las DCs inducida por micobacterias y dicha maduración se restablece cuando se bloquea DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2003). El tratamiento de DCs con ManLAM también induce el incremento de la

secreción de IL-10, lo que resulta en una reducción de la respuesta de las células T secretoras de IFN- $\gamma$  (T. Wu et al., 2011). Los Ags lipídicos micobacterianos derivan fundamentalmente de la pared celular. Las moléculas CD1 tienen una capacidad única para presentar Ags lipídicos. Las Mo-DCs expresan moléculas CD1 y pueden interactuar con células T CD8 restringidas por CD1, células T  $\alpha\beta$ , células T  $\gamma\delta$  y células NK (Fischer et al., 2004; Schaible et al., 2000). Estos Ags lipídicos incluyen el ácido micólico (Beckman et al., 1994.), los lipoarabinomananos (Sieling et al., 1995.; Torrelles et al., 2012), manósidos de fosfatidilinositol (Cala-De Paepe et al., 2012; Ernst et al., 1998), monomicolato de glicerol (Layre et al., 2009), entre otros. Las células T específicas de Ags lipídicos activadas mediante esta presentación de Ags no convencional podrían desempeñar funciones protectoras durante la infección por Mtb (Liberio & Mori, 2014). A pesar de que Mtb inhibe la formación de un complejo de moléculas MHC de clase II y péptidos en las DCs durante la infección, la presentación no convencional de Ags a través de CD1 puede inducir una rápida presentación de Ags y, por tanto, una respuesta de células T restringida a CD1 (Hava et al., 2008). Sin embargo, Mtb también puede inducir la evasión inmunitaria inhibiendo la expresión de CD1 en las DCs (Stenger et al., 1998). Adicionalmente, Mtb también dispone de Ags de naturaleza proteica, como ESAT-6, el cual es uno de los principales Ags de Mtb, e inhibe la maduración de los DCs humanas y la producción de IL-12, pero promueve la secreción de IL-23 e IL-1 $\beta$  lo que a su vez fomenta una respuesta Th17 en lugar de Th1 (X. Wang et al., 2012). La autofagia es un mecanismo homeostático que puede participar en la defensa del hospedero como un proceso de múltiples pasos que implica encerrar y lisar la carga intracitoplasmática, como Mtb, fusionándose con los lisosomas y favoreciendo la presentación de Ags. La fusión autofagosoma-lisosoma en DCs humanas fue inhibida por la infección con la cepa virulenta H37Rv de Mtb a través de la actividad del sistema de secreción ESAT-6-1 (ESX-1) (Romagnoli et al., 2012).

Aunque se desarrolla una respuesta inmune adaptativa robusta frente a *Mtb*, en la mayoría de los casos ésta se retrasa y no consigue esterilizar la infección. En modelos animales, transcurren varias semanas antes de que se detecten células T Ags-específicas en los pulmones. Del mismo modo, en humanos transcurren entre 2 y 8 semanas antes de que se detecten respuestas de células T específicas contra *Mtb*. Este retraso en la llegada de la respuesta inmune está asociado a la capacidad de *Mtb* de alterar la actividad migratoria de las DCs infectadas hacia ganglios linfáticos, tanto en modelos *in vitro* (Rajashree et al., 2008; Roberts & Robinson, 2014) como *in vivo* (Lai et al., 2018; Wolf et al., 2007). Por lo tanto, el estudio sobre los factores que afectan la regulación de la migración de las DCs constituye un punto clave para mejorar nuestro entendimiento sobre cómo mejorar el control de la infección tuberculosa. En este trabajo de tesis doctoral, abordaremos el estudio de las funciones de las DCs en la TB desde la perspectiva del inmunometabolismo.



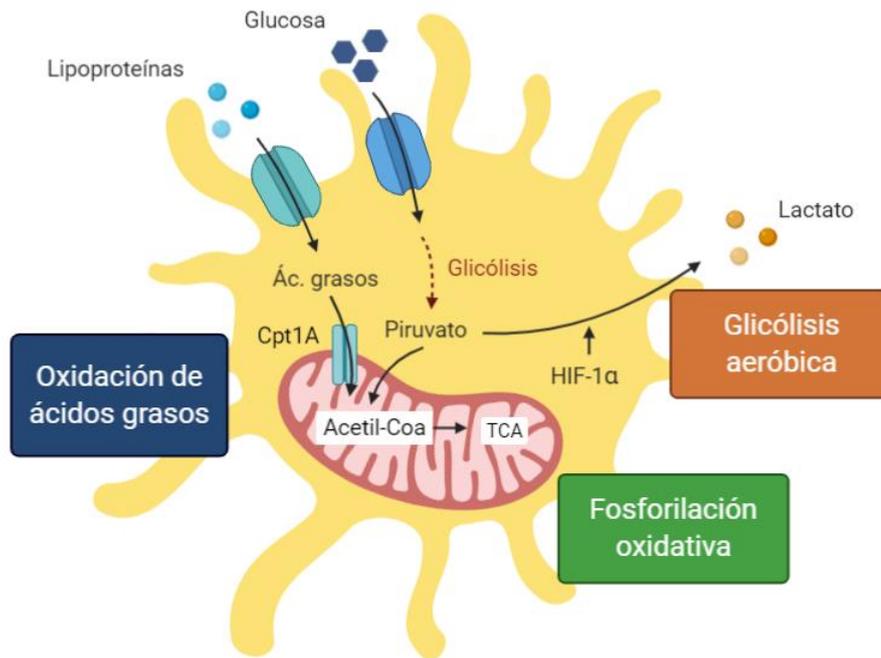
**Figura 2. Los mecanismos de evasión/patogénicos de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) modulan la funcionalidad de las células dendríticas (DCs).**

*Mtb* dispone de distintas estrategias para escapar de la respuesta inmune del hospedador. En particular dentro de los principales mecanismos que afectan a las DCs se encuentran: 1) Su capacidad de interferir con la diferenciación de monocitos humanos a DCs, generando DCs aberrantes (Balboa et al., 2016). 2) Las DCs poseen una baja capacidad de presentar Ags micobacterianos y de estimular células T CD4+ específicas para *Mtb* (Balboa et al., 2010; Wolf et al., 2008a). 3) La infección con *Mtb* disminuye el tráfico de las DCs a ganglios linfáticos (Roberts & Robinson, 2014). 4) Las DCs pueden reconocer a *Mtb* a través del receptor de lectinas DC-SIGN lo cual promueve la producción de IL-10, en detrimento de una respuesta inflamatoria (Geijtenbeek et al., 2003).

### Inmunometabolismo: las vías metabólicas determinan la funcionalidad de las células inmunes

Durante una infección bacteriana intracelular, las células eucariotas realizan cambios en su metabolismo que les permiten combatir al patógeno, aunque también pueden facilitar que el microbio obtenga nutrientes y energía (Eisenreich, W., Heesemann, J., Rudel, T. & Goebel, 2013). En este contexto, el "inmunometabolismo" se ha consolidado como un nuevo campo de investigación que examina cómo las vías metabólicas interactúan con la respuesta inmune (Mathis & Shoelson, 2011). A pesar de que los primeros hallazgos en este ámbito se produjeron hace casi un siglo, estudios recientes han esclarecido las bases moleculares detrás de la regulación de la captación y el metabolismo de nutrientes en células inmunes, tanto en reposo como en actividad. Procesos metabólicos esenciales, como la respiración aeróbica, la glicólisis y la glutaminólisis, son cruciales para las funciones del sistema inmune y, por lo tanto, pueden ser atacados por diversos patógenos que intentan evadir la respuesta inmune (E. L. Pearce & Pearce, 2013).

La glucosa actúa como la principal fuente de carbono en las células de mamíferos y se convierte en piruvato mediante la **glicólisis**. Este piruvato puede entrar en la mitocondria y participar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs, donde se llevan a cabo reacciones de oxidación que producen intermediarios de carbono y compuestos reductores. Los compuestos NADH y FADH<sub>2</sub> transfieren electrones a los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna. Este proceso de transferencia de electrones está vinculado al bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico que la ATP sintetasa utiliza para generar grandes cantidades de ATP (entre 36 y 38 moléculas por cada molécula de glucosa). Además, esta transferencia de electrones facilita la formación de agua a partir del oxígeno, que actúa como el aceptor final. Así, la **fosforilación oxidativa (OXPHOS)** requiere oxígeno. Si no hay oxígeno presente, el piruvato se metaboliza en lactato en el citoplasma. Sin embargo, en ciertas condiciones, el piruvato puede convertirse preferentemente en lactato incluso en presencia de oxígeno, un fenómeno conocido como **glicólisis aeróbica (Figura 3)**.



**Figura 3. Principales rutas metabólicas involucradas en la regulación de las funciones efectoras de las células inmunes.**

Se muestran las vías metabólicas más salientes de la glucosa y ácidos grasos. La glucosa para promover la generación de ATP mediante su conversión a piruvato y luego a lactato en presencia de oxígeno mediante glicólisis aeróbica mediada por HIF1A, o mediante su derivación a Acetil-CoA e ingreso al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) promoviendo la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna (OXPHOS). Los ácidos grasos incorporados pueden ser oxidados en las mitocondrias e incorporarse de igual modo al ciclo de Krebs.

### **El factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1A) orquesta la reprogramación metabólica de las células inmunes**

Los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) son fundamentales para que las células respondan a la falta de oxígeno, organizando un programa transcripcional que asegura una adaptación adecuada en términos funcionales, metabólicos y vasculares en situaciones de hipoxia (Semenza, 2011). Estos factores son cruciales en múltiples contextos, tanto normales como patológicos, y tienen un rol importante en procesos tumorales, donde influyen en el crecimiento del tumor, la formación de nuevos vasos sanguíneos y la metástasis (Semenza, 2014). También son relevantes en casos de isquemia y en el ciclo celular de las células madre hematopoyéticas (Semenza, 2014; Takubo et al., 2010).

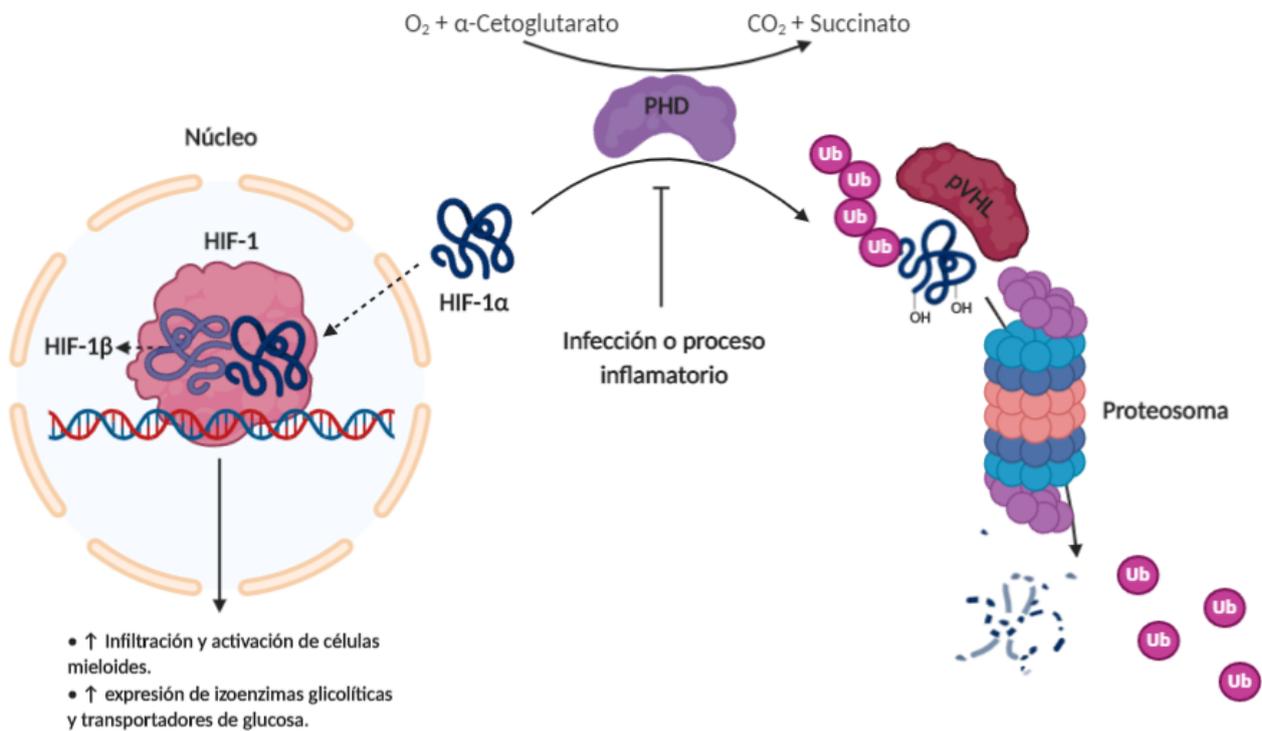
Originalmente, las funciones del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1A) se relacionaban principalmente con la cantidad de oxígeno disponible. No obstante, se ha demostrado que diversos estímulos en condiciones de normoxia pueden activar HIF, especialmente en células del sistema inmune,

lo que resulta en la activación de genes específicos.

HIF forma un complejo heterodimérico que regula la transcripción de genes que contienen la secuencia 5'-RCGTG-3', conocida como elemento de respuesta a hipoxia (HRE) (Semenza et al., 1996; G. L. Wang et al., 1995). La expresión de HIF1A es controlada tanto a nivel de transcripción como de modificaciones postraduccionales. Normalmente, los niveles de HIF1A son bajos debido a su degradación por el proteasoma, tras ser hidroxilada por prolin hidrolasas dependientes de oxígeno (PHD) (Bruick & McKnight, 2001)(**Figura 4**). Estas PHD son enzimas que utilizan oxígeno para añadir grupos hidroxilo a residuos específicos de prolina en HIF1A (Bruick & McKnight, 2001). Durante infecciones o procesos inflamatorios, se incrementa la producción de HIF1A y se inhiben las PHD, lo que permite que HIF1A alcance niveles elevados. Esto a su vez activa diversos procesos celulares, incluyendo la infiltración y activación de células mieloides, así como la inducción de isoenzimas glicolíticas y transportadores de glucosa (Cramer et al., 2003; Jantsch et al., 2008).

HIF1A, aunque inicialmente reconocido por su función en hipoxia, también es crucial para la regulación del metabolismo en condiciones normales, particularmente en la glicólisis aeróbica (Bhandari & Nizet, 2014; Rius et al., 2008a). Un importante regulador de HIF1A es el complejo I de mTOR (mTORC1), que puede activarlo en respuesta a citoquinas, altos niveles de succinato y ROS (Finlay et al., 2012; Movafagh et al., 2015; Tannahill et al., 2013). Además, el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) también influye en la expresión de HIF1A. Se ha demostrado que las infecciones bacterianas y la estimulación con LPS aumentan la actividad de NF- $\kappa$ B en fagocitos, lo que a su vez favorece la transcripción del ARN mensajero de HIF1A y de genes pro-inflamatorios (Rius et al., 2008b). Esto también eleva la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT1), que es fundamental para el transporte de glucosa en las células mieloides (McNamee et al., 2013).

Por otra parte, también regula la expresión de la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA), que convierte piruvato en lactato (Cramer et al., 2003), al igual que otras enzimas como las hexoquinasa HK1 y HK2, y genes que codifican componentes de la maquinaria glicolítica (Blouin et al., 2004; Braverman et al., 2016). HIF1A se expresa en una amplia variedad de células, incluyendo aquellas del sistema inmune innato y adaptativo, como linfocitos (Kido et al., 2020), neutrófilos (Yetkin-Arik et al., 2019), DCs, (Forsythe et al., 1996) macrófagos (Corcoran & O'Neill, 2016) y monocitos (Codo et al., 2020).



**Figura 4. Mecanismo de regulación post-traducciona de HIF1A en células inmunes.**

En presencia de oxígeno, HIF1A es hidroxilado por PHD, enzimas que dependen del oxígeno y cofactores de hierro. Cuando HIF1A es proil-hidroxilado, se poliubiquitina, marcándolo para la degradación por el proteosoma. Cuando la tensión de oxígeno disminuye, la actividad de PHD se encuentra inhibida, lo que conduce a la acumulación de HIF1A, su traslocación nuclear, la heterodimerización con HIF1B y el reclutamiento de p300/CBP.

### Inmunometabolismo en DCs

Como se mencionó previamente, las DCs expresan distintos PRRs que permiten el reconocimiento de señales “peligrosas”. Luego de la interacción con alguno de estos receptores, las DCs sufren una remodelación fenotípica a gran escala que determina sus funciones efectoras. Estos cambios en la biología de las DCs están acompañados por cambios profundos en el metabolismo celular que son integrales y esenciales para el proceso de activación (E. J. Pearce & Everts, 2015).

### Perfil metabólico durante la diferenciación de monocitos a DCs (Mo-DCs)

La infiltración de monocitos en los tejidos periféricos es una característica común de los procesos inflamatorios (V. I. Patel et al., 2017). La delicada regulación entre el microambiente tisular y la reprogramación metabólica es crucial para garantizar la correcta diferenciación de las Mo-DCs. En un microambiente inflamatorio, la reducción del pH reprograma drásticamente

el metabolismo celular durante la diferenciación de los monocitos en Mo-DCs. En dicho proceso, la glicólisis se desplaza hacia el metabolismo mitocondrial y la biosíntesis del colesterol (Erra Díaz et al., 2020).

En comparación con las Mo-DCs humanas, los monocitos dependen más de la glicólisis que de la OXPHOS. En el quinto día de diferenciación *in vitro* de monocitos inducida por GM-CSF e IL-4, la capacidad glicolítica disminuye del 82% al 28%, acompañada de un aumento de la dependencia de las mitocondrias del 18% al 72% (Adamik et al., 2022); coincidiendo con el aumento significativo del número de mitocondrias y regulación positiva de los genes de la cadena de transporte de electrones (ETC) y del ciclo de Krebs en los observados en Mo-DCs humanos (Pence & Yarbro, 2019). En concordancia, durante la diferenciación las mitocondrias experimentan una biosíntesis activa, y se elevan los niveles de los inductores fundamentales de la biosíntesis mitocondrial, como PPAR $\gamma$  y el factor de transcripción mitocondrial A, lo que puede explicar el aumento de la respiración mitocondrial y la producción de ATP (Zaccagnino et al., 2012). El aumento de la tasa de consumo de oxígeno y ATP en las Mo-DCs humanas se utiliza para apoyar funciones dependientes de energía, como la actividad de captación de A $\beta$ s y la migración. Es importante destacar que el bloqueo del ETC con el inhibidor del complejo I durante la diferenciación conduce a la apoptosis e impide parcialmente el desarrollo de Mo-DCs (Del Prete et al., 2008; Zaccagnino et al., 2012).

mTOR es un sensor de nutrientes celulares que desempeña un papel importante en el crecimiento y la supervivencia celular y también es un regulador metabólico central de la inmunidad (Morita et al., 2015). La diferenciación de las Mo-DCs humanas depende de la vía PI3K-mTORC1, y el inhibidor de mTORC1, rapamicina, es capaz de abolir la diferenciación de las Mo-DCs, lo que concuerda con la activación de mTOR por GM-CSF/IL-4 para mantener la supervivencia (Snyder & Amiel, 2019). Además, la inhibición de la señalización mTORC1 reduce fuertemente la biogénesis mitocondrial y la respiración en las células, lo que conduce a una disminución del número de mitocondrias y a la inactivación del ETC. Por otro lado, PPAR $\gamma$  promueve la diferenciación de las Mo-DCs principalmente mediante el control del metabolismo de los lípidos (Gogolak et al., 2007; Szatmari et al., 2004). El bloqueo de la acetil-CoA carboxilasa inhibe la síntesis citosólica de ácidos grasos (FAS) y reduce la diferenciación de los Mo-DCs (Rehman et al., 2013). Por lo tanto, al infiltrar en un tejido inflamatorio, los monocitos sufren una remodelación metabólica que involucra la disminución de la glicólisis, un aumento de la OXPHOS mitocondrial, biogénesis mitocondrial y anabolismo de ácidos grasos, lo que promueve conjuntamente la diferenciación de los monocitos en Mo-DCs y están controlados por mTOR.

### Rearreglos metabólicos que sufren las DCs inmunogénicas frente a un estímulo

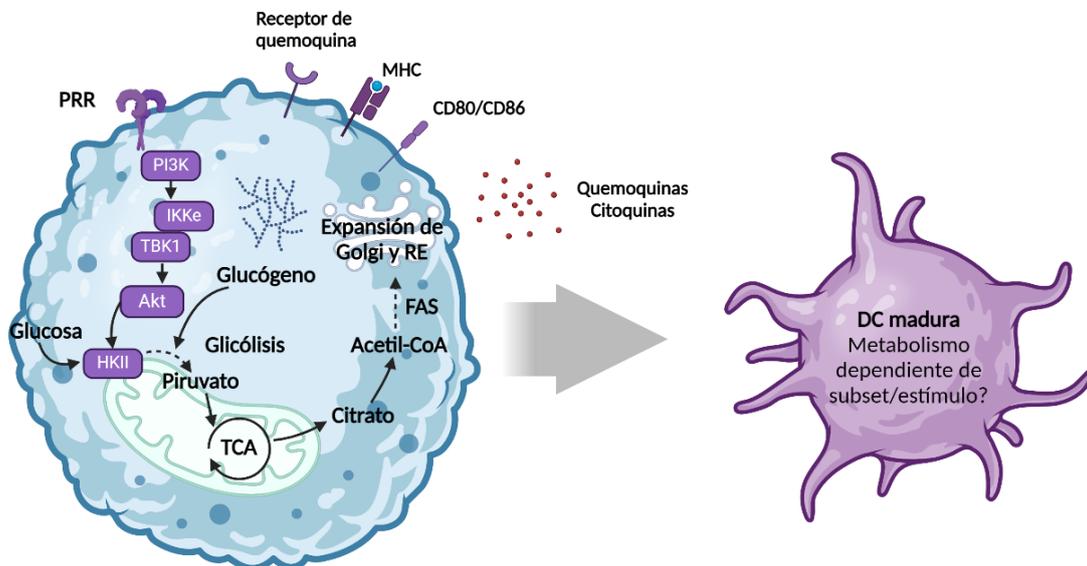
Las DCs quiescentes presentan un metabolismo catabólico, donde continuamente degradan nutrientes para la generación de energía y el mantenimiento celular. Dicho estado metabólico está caracterizado por una OXPHOS activa, impulsada por el TCA que es alimentado por la oxidación de los ácidos grasos (FAO) y la glutaminólisis, y regulada principalmente por AMPK (Kelly & O'Neill, 2015; Krawczyk et al., 2010a; E. J. Pearce & Everts, 2015). Además de la glucosa, las DCs en este estado de quiescencia usan el glucógeno intracelular para apoyar las demandas basales de la glicólisis, la cual provee sustratos metabólicos para la respiración (Wculek et al., 2019).

Frente a un estímulo inmunogénico, las DCs inician un proceso de activación donde adoptan un metabolismo anabólico para la generación de sustratos que serán utilizados para la biosíntesis y el crecimiento celular. Las DCs activadas, sufren un cambio metabólico hacia la glicólisis aeróbica que provee energía y, adicionalmente, dirige intermediarios glicolíticos hacia la ruta de las pentosas fosfato (PPP). Además, en algunas poblaciones de DCs, se induce la producción de óxido nítrico, el cual inhibe la cadena de transporte de electrones. En consecuencia, los intermediarios del TCA se acumulan y sirven como señales inmunomodulatorias y promueven la síntesis de ácidos grasos (FAS) (**Figura 5**) y la producción de ROS y óxido nítrico durante la activación de las DCs (Kelly & O'Neill, 2015; O'Neill & Pearce, 2016; E. L. Pearce & Pearce, 2013; D. G. Ryan & O'Neill, 2017).

Es importante destacar que la mayoría de los conocimientos generados hasta el momento fueron obtenidos en modelos de DCs derivadas de médula ósea (BMDC) de murinos. Si bien este modelo de cultivo de DCs provee importantes conocimientos en las bases de las adaptaciones metabólicas que sufren las DCs durante el proceso de activación celular, se han observado respuestas diferenciales dependiendo la población de DCs en estudio.

A pesar de las diferencias señaladas, está ampliamente aceptado para las poblaciones de DCs (tanto humanas como murinas) que luego de la estimulación de PRRs con un amplio rango de PAMPs ocurre un incremento temprano de la glicólisis (Everts et al., 2012; Everts & Pearce, 2014; Jantsch et al., 2008; Krawczyk et al., 2010a; Márquez et al., 2017; Wculek et al., 2019), lo cual es característico de las DCs activadas. La inducción de la glicólisis temprana es necesaria para varios aspectos asociados a la maduración celular como, por ejemplo, el incremento de la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie y la producción de citoquinas. Si bien no se han encontrado hasta el momento mayores efectos en la fagocitosis y la captación de Ags, la activación de las DCs lleva a una remodelación del citoesqueleto que apoya la migración celular hacia ganglios linfáticos y zonas T y este proceso es

dependiente de la glicólisis. Por lo tanto, el incremento de la glicólisis en las DCs frente al desafío con un estímulo es vital para una adecuada inducción de la respuesta adaptativa de células T (de Lima Thomaz et al., 2018) y, por ende, regula la homeostasis.



**Figura 5. Reprogramación metabólica a tiempos tempranos de la activación de las DCs.**

La estimulación de DCs inmaduras mediada por PRR resulta en una reestructuración metabólica, llevando a un aumento de la glicólisis alimentada por las reservas de glucógeno intracelular y que depende de PI3K-IKKe-TBK1. Esta glicólisis sostiene la FAS, lo cual promueve la expansión del retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi, proceso necesario para la síntesis proteica de moléculas coestimuladoras, quemoquinas y citoquinas. Seguido de esta activación temprana, las DCs maduras obtienen un metabolismo celular que depende del estímulo inicial, así como también del tipo celular. Figura adaptada de (Møller et al., 2022).

### La unión a distintos PRRs gatilla un metabolismo diferencial en Mo-DCs inmunogénicas en etapas tardías de maduración

Aunque se ha demostrado que el aumento de la glicólisis es una respuesta metabólica conservada a la maduración de las DCs, esta reprogramación metabólica cambia con el tiempo. En la fase tardía de la estimulación (después de 12 h en modelos *in vitro*, (Møller et al., 2022)) la activación de diferentes PRR desencadena diferentes adaptaciones metabólicas en las DCs, otorgándole a las DCs una flexibilidad metabólica que le permite moldear sus funciones inmunogénicas.

En respuesta a la activación inducida por LPS mediante la unión a TLR4, las BMDC murinas se caracterizan por un incremento marcado de la glicólisis y una interrupción de la actividad mitocondrial que dura hasta 24h (Everts et

al., 2012, 2014; Krawczyk et al., 2010b). Sin embargo, en Mo-DCs humanas, si bien existe un aumento del metabolismo glicolítico tras la activación con LPS, el aumento solo ocurre de forma transitoria y moderada y está acompañado de un incremento de la OXPHOS.

El receptor de lectina de macrófagos que une galactosa (MGLR), un receptor de lectinas de tipo C, se expresa en la superficie de DCs y macrófagos asociados a tumores (Heger et al., 2018; Sahasrabudhe et al., 2019). La interacción de MGL con su receptor, reduce la glicólisis en Mo-DCs humanas mediada por la actividad de HIF1A y dicha reducción suprime el estado proinflamatorio de las Mo-DCs, lo que inhibe aún más las respuestas inmunitarias antitumorales, conduciendo al escape del tumor (van Vliet et al., 2008).

Por otro lado, la estimulación por vía TLR7/8 gatilla un metabolismo asociado a la OXPHOS y FAO necesario para la maduración de las Mo-DCs. Esta actividad metabólica se encuentra regulada por PINK1, la cual se localiza en la membrana externa mitocondrial y está involucrada en funciones mitocondriales (Basit & de Vries, 2019).

Por lo tanto, la remodelación metabólica que sufren las DCs no solo depende del tipo celular, sino que también varía, al menos en tiempos tardíos, dependiendo del estímulo y que PRR lo reconoce.

### Regulación metabólica de las DCs tolerogénicas

Las DCs no solo son críticas para iniciar la respuesta inmune adaptativa, sino que también son importantes para mantener la tolerancia. Las DCs confieren tolerancia periférica presentando continuamente Ags propios como DCs inmaduras en la ausencia de factores proinflamatorios, silenciando las respuestas de las células T autorreactivas y promoviendo la generación de células T regulatorias (Everts et al., 2014; Iberg et al., 2017). A pesar de que las DCs inmaduras son tolerogénicas, estas pueden ser activadas cuando son expuestas a un estímulo inflamatorio. Sin embargo, la tolerancia de las DCs en algunos casos puede mantenerse a pesar de estar en un ambiente inflamatorio, lo cual puede ser beneficioso en enfermedades autoinflamatorias, pero también puede llevar a la supresión de las funciones de las DCs en microambientes tumorales o durante una infección, facilitando la evasión de la respuesta inmune. Varios factores, incluyendo IL-10, TGF- $\beta$ , glucocorticoides, vitamina D y dexametasona, pueden promover la generación de DCs tolerogénicas, siendo algunos de estos factores empleados para generar DCs tolerogénicas in-vitro.

Las DCs tolerogénicas también presentan un perfil metabólico distintivo. Cuando se analiza la expresión de genes relacionados a las vías metabólicas, se observan diferencias fundamentales entre DCs

inmunogénicas y tolerogénicas, en los que se ha demostrado que existe un incremento en la expresión de genes relacionados a la OXPHOS, especialmente de genes asociados a los complejos II y IV de la cadena transportadora de electrones. Además, IL-10, una citoquina característica de las DCs tolerogénicas, bloquea el cambio metabólico que ocurre durante la estimulación de receptores TLR favoreciendo la OXPHOS en detrimento de la glicólisis (Sim et al., 2016), en línea con el incremento de la actividad mitocondrial y de la producción de ROS observado en las DCs tolerogénicas. Dicha actividad mitocondrial se asocia a un incremento de la FAO y la utilización de triglicéridos como fuente de carbono. Similar a las células T quiescentes, el perfil catabólico y la alta demanda de energía en las DCs tolerogénicas puede estar relacionado a su activa función supresora. Por lo tanto, las DCs tolerogénicas poseen una gran plasticidad metabólica, presentando un metabolismo activo, a pesar de mostrar diferentes dependencias de la glicólisis vs FAO/OXPHOS. Sin embargo, estas conclusiones están basadas únicamente en estudios realizados en Mo-DCs humanas, y el metabolismo de otras poblaciones de DCs tolerogénicas en diseños *in vivo* no ha sido explorado.

### HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO GENERAL

Parte del éxito de Mtb como patógeno reside en su capacidad para evitar la generación de una respuesta adaptativa robusta, lo cual facilita su persistencia y cronicidad. La generación de una respuesta inmune eficiente requiere de DCs competentes, lo cual, en condiciones experimentales, se asocia a un metabolismo glicolítico dependiente del factor de transcripción HIF1A. Si bien se conocen numerosas adaptaciones de Mtb que resultan en estrategias de evasión de la respuesta inmune, hasta el momento no hay estudios que evalúen el perfil metabólico de las DCs en el marco de la TB. Previamente nuestro grupo de trabajo demostró que Mtb interfiere con la generación de DCs a partir de monocitos humanos (Balboa et al., 2010, 2013b, 2016b) y que el microambiente tuberculoso inhibe la actividad glicolítica en macrófagos, promoviendo el establecimiento de un metabolismo mitocondrial asociado a un fenotipo susceptible al crecimiento bacilar (Marín Franco et al., 2020). Teniendo en cuenta que el establecimiento de DCs inmunogénicas constituye un paso crucial en la generación de la respuesta inmune protectora frente a Mtb, y siendo que la vía glicolítica de las células inmunes está íntimamente asociada a la activación celular, proponemos como hipótesis de este trabajo que **la modulación de la vía glicolítica impactará en la calidad de la respuesta inmune desarrollada frente a Mtb y, por lo tanto, en el curso de la enfermedad tuberculosa.**

En base a estos antecedentes, el objetivo de este trabajo consiste en **dilucidar el rol protector o patológico de la glicólisis de las DCs en respuesta a Mtb**, incluyendo los siguientes objetivos específicos:

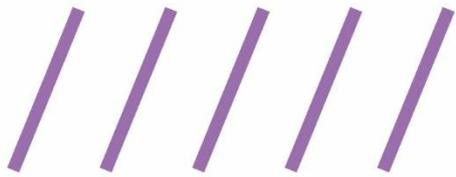
- 1. Estudiar exhaustivamente el metabolismo de las células dendríticas (DCs) humanas en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y sus implicancias funcionales.** Este objetivo incluye la caracterización de la vía de señalización involucrada, abarcando tanto los receptores como los factores de transcripción implicados, así como el impacto de esta inducción en las funciones efectoras de las DCs. Se prestará especial atención a la capacidad de polarización de los clones de células *T helper* (Th) y a la actividad migratoria de las DCs.
- 2. Investigar el impacto de la modulación del eje glicólisis/HIF1A en las DCs infectadas con la cepa vacunal BCG sobre el inicio de la respuesta inmune adaptativa.** Este objetivo busca comprender cómo esta modulación influye en la llegada de las DCs a los ganglios linfáticos drenantes y en la aparición de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos en el contexto de la inmunización con BCG.
- 3. Analizar la actividad glicolítica de los monocitos en pacientes con TB,** estableciendo su relación con la capacidad de generación de DCs y los

## Hipótesis y objetivos

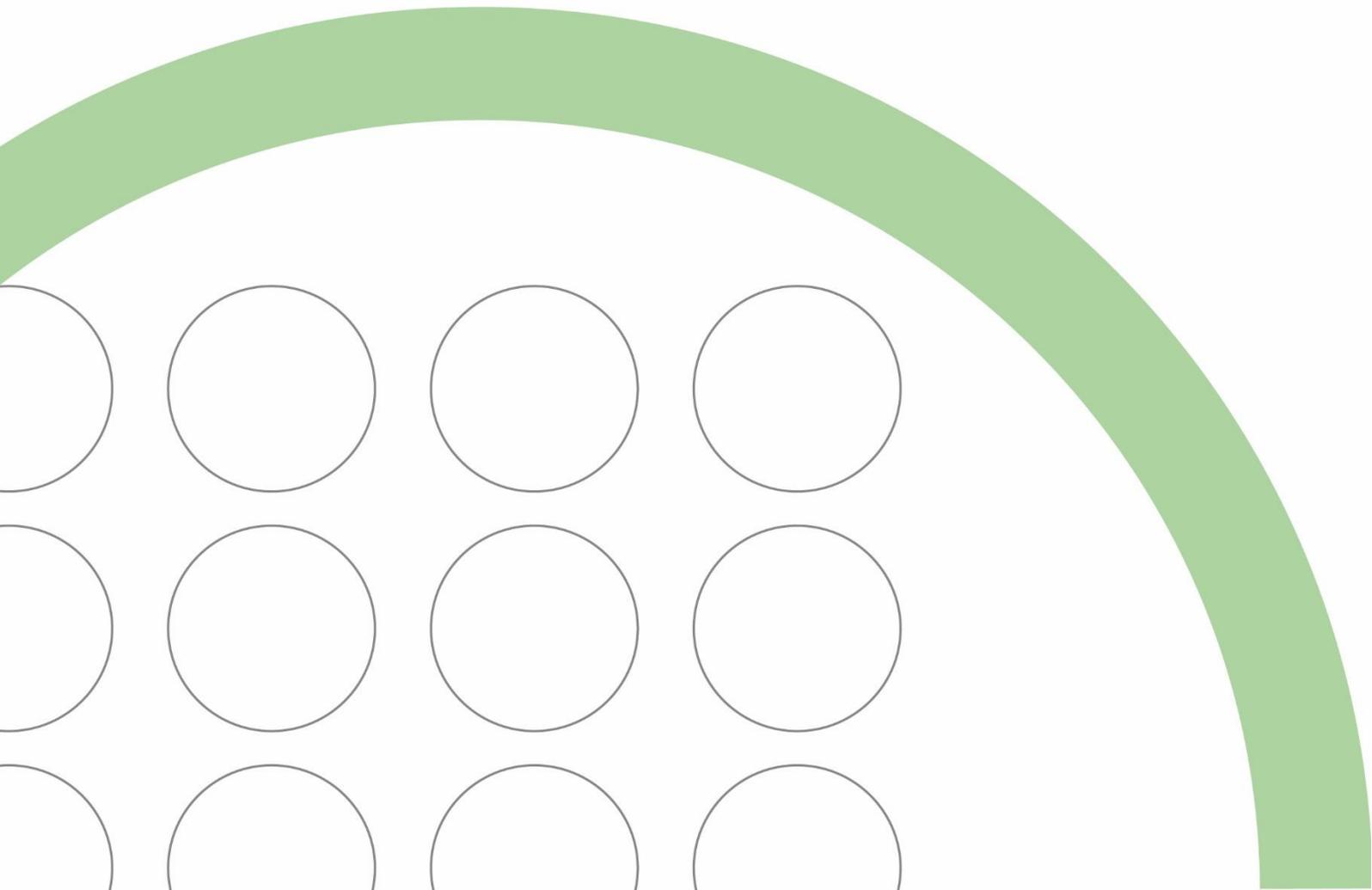
posibles factores que contribuyen a modular el metabolismo de los monocitos en circulación.

El **Capítulo I** de esta tesis doctoral abordará en su totalidad el primer objetivo específico, así como parte del tercer objetivo. El **Capítulo II** estará dedicado al desarrollo del segundo objetivo específico y el **Capítulo III** reunirá avances sobre los factores involucrados en la adquisición del perfil metabólico de los monocitos en el contexto de la TB.

Consideramos que profundizar nuestros conocimientos sobre el metabolismo de las DCs, y de sus precursores, nos permitirá avanzar en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el establecimiento de la respuesta protectora contra la TB.

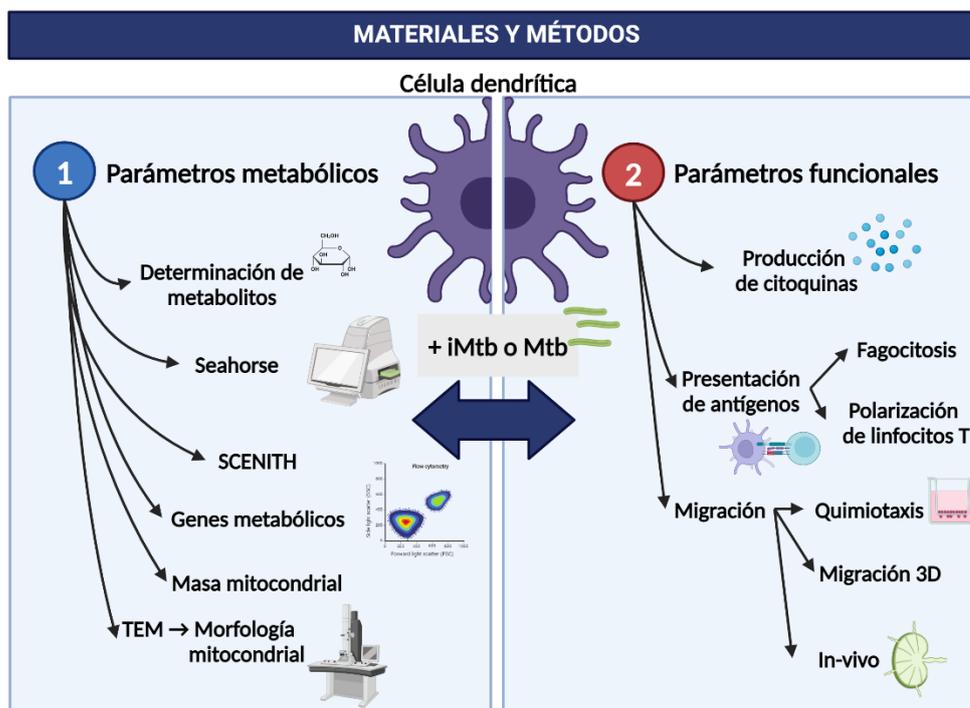


# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

## Capítulo I



**Figura 6. Resumen gráfico de la metodología implementada para el capítulo I**

### Reactivos químicos

El LPS de *Escherichia coli* O111:B4 se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). La dexametasona (Dx) provino de Sidus (Buenos Aires, Argentina). PX-478 2HCL se adquirió de Selleck Chemicals (Houston, EE.UU.) y DMOG de Santa Cruz, Biotecnología (Palo Alto, CA, EE.UU.). Además, GSK2837808A se adquirió de Cayman Chemical (Michigan, EE.UU.) junto con equinomicina (Ech) y oxamato sódico (OX).

### Cepa de *M. tuberculosis* empleada

La cepa de referencia H37Rv de Mtb fue crecida a 37°C en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10% v/v oleato-albúmina-dextrosa-catalasa (Difco) y 0.05% v/v de Tween-80 (Sigma-Aldrich). La cepa  $\gamma$ -irradiada H37Rv (NR-49098), aquí denominada **iMtb**, fue provista por el *BEI Resources Repository*, EE.UU. La cepa de Mtb expresando la proteína

fluorescente roja (RFP) fue gentilmente cedida por la Dra. Fabiana Bigi (INTA, Castelar, Argentina).

### Animales

Todos los protocolos experimentales que involucraron animales fueron aprobados por el comité institucional de cuidado animal y uso de animales de experimentación (CICUAL número 090/2021) del Instituto de Medicina Experimental (IMEX) – CONICET, ANM. Se emplearon ratones hembra C57BL/6 de entre 4 a 8 semanas de vida para los experimentos con BCG. Adicionalmente para algunos experimentos de migración *in-vivo* se utilizaron ratones BALB/c hembras de entre 4 a 8 semanas de edad, ya sea transfiriendo BMDC estimuladas con iMtb o infectadas con BCG.

### Preparación de DCs derivadas de monocitos humanos

Con el objetivo de obtener un gran número de monocitos humanos, se utilizaron concentrados leucocitarios (*buffy coats*) de donantes sanos que son producto secundario de una centrifugación para concentrar glóbulos rojos o plasma destinados a transfusión. Estos *buffy coats* fueron preparados en el Centro Regional de Hemoterapia del Htal. Garrahan (Buenos Aires, Argentina), según las pautas del acuerdo de servicios acordado entre las Drs. Balboa (IMEX/INBIRS) y S. Kuperman (Garrahan). Se obtuvo el consentimiento informado de cada donante antes de la colecta de sangre. A partir de estos concentrados leucocitarios, se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica mediante una separación por gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Reino Unido) y posteriormente los monocitos (CD14<sup>+</sup>) fueron purificados mediante centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll (GE Healthcare). Se estimó su concentración final mediante recuento en cámara de Neubauer y, seguidamente, se determinó la pureza mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD14. Procuramos emplear cultivos con un porcentaje de pureza inicial superior al 90% de monocitos. Luego, los monocitos fueron adheridos en placas de cultivo en una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml durante 1h a 37°C en medio RPMI-1640 precalentado (Gibco, EE.UU.). A continuación, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) tibia. Los monocitos adheridos fueron diferenciados hacia DCs durante 6 días en medio suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich) en presencia de 10 ng/ml del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, Peprotech, EE.UU.) y 20 ng/ml de IL-4 (Biolegend, EE.UU.), renovando la mitad del medio de diferenciación cada 2 días.

### Muestras de pacientes con TB

Los pacientes con TB fueron diagnosticados en la División Tisioneumonología del Hospital F.J. Muñiz y en el Instituto Vaccarezza (Buenos Aires, Argentina) por la presencia de síntomas respiratorios clínicos recientes, radiografía de tórax anormal y cultivo de esputo positivo o bacilos ácido-alcohol resistentes positivos. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de acuerdo con el Comité de Ética Institucional del Instituto Vaccarezza. Entre los criterios de exclusión se incluyeron los pacientes seropositivos y la presencia de enfermedades infecciosas concurrentes o comorbilidades. Se recogieron muestras de sangre durante los primeros 15 días tras el inicio del tratamiento. Todos los pacientes tenían TB pulmonar (**Tabla 1**). La investigación se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2013) y ha sido aprobada por los comités de ética del Hospital Muñiz (número de protocolo: NIN-1671-12 renovado en 2021) y de la Academia Nacional de Medicina.

**Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes con TB**

|  |   |
|--|---|
| <b>Edad, años (rango)</b>                      | 36 (19-67)  |
| <b>Sexo, % (número/total)</b>                  | M, 81% (31/38)<br>F, 19% (7/38)   |
| <b>Nacionalidad, % (número/total)</b>          | Argentina, 76,31% (29/38)<br>Boliviana, 15,78% (6/38)<br>Paraguaya, 2,63% (1/38)<br>Peruana, 5,26% (2/38) |
| <b>Localización de la TB, % (número/total)</b> | Pulmonar, 94% (36/38)<br>Pulmonar + Extrapulmonar, 6% (2/38)  |
| <b>BAAR* en esputo, % (número/total)</b>       | 3+, 21% (8/38)  |

|  |  |
|--|--|
|  | 2+, 13% (5/38)<br>1+, 52% (20/38)<br>-, 13% (5/38) |
| <b>Recuento de leucocitos, media <math>\pm</math> SEM, células/<math>\mu</math>L</b> | 8483 $\pm$ 509                                     |
| <b>Media <math>\pm</math> SEM de linfocitos, %</b>                                   | 19 $\pm$ 2   |
| <b>Media <math>\pm</math> SEM de monocitos, %</b>                                    | 7 $\pm$ 0,5  |

\*Bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en esputo: -, 1+, 2+, 3+ se definen según la escala de cuantificación de la Unión Internacional contra la Tuberculosis y las Enfermedades Respiratorias (UIT-TLD)/Organización Mundial de la Salud (OMS).

### Estimulación de las DCs

Las DCs diferenciadas a partir de monocitos humanos fueron estimuladas tanto con iMtb como con Mtb viable con dosis equivalentes en términos de DO<sub>600</sub> durante 24h a 37°C con el fin de inducir su activación. Para determinados ensayos, se trataron DCs con el LPS de la cepa *Escherichia coli* O111:B4 (10ng/ml, Sigma-Aldrich) durante 24h a 37°C a fin de obtener un control positivo de maduración. Las infecciones con Mtb viable se realizaron en el laboratorio de bioseguridad nivel 3 de la Unidad Operativa Centro de Contención de Biológica, ANLIS-MALBRAN (Buenos Aires) y del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida (INBIRS) según las normas de bioseguridad de cada institución.

### Tratamientos de las DCs

En los ensayos indicados, se añadieron anticuerpos monoclonales neutralizantes (mAb), o sus correspondientes controles de isotipo, 30 min antes de la estimulación de las DCs para inhibir TLR2 (cat. 309717, Biolegend) o TLR4 (cat. 312813, Biolegend). Además, las DCs se incubaron alternativamente con PX-478 (20  $\mu$ M) o equinomicina (1 nM) con el fin de inhibir la actividad de HIF-1A, con DMOG (50  $\mu$ M) para estabilizar los niveles de HIF-1A, y con OX (20 mM) o GSK2837808A (20  $\mu$ M) para inhibir la actividad de la enzima LDH. La estimulación de DCs con iMtb o su infección con la

micobacteria viable se produjo 30 min después del tratamiento sin lavado de fármacos.

Adicionalmente, se generaron células dendríticas tolerogénicas inducidas por dexametasona (Dx-DCs) incubando las DCs con 0,1  $\mu$ M de dexametasona durante 1 h. Posteriormente, se lavaron las células y se añadió RPMI con 10% SFB.

### Determinación de concentraciones de metabolitos

La producción de lactato y el consumo de glucosa en el cultivo celular se determinó mediante ensayos espectrofotométricos utilizando los *kits* de *Lactate* y *Glicemia Enzimática* (Wiener, Argentina) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Estos *kits* están basados en la oxidación del lactato o la glucosa, con la consiguiente producción de peróxido de hidrógeno (Barham & Trinder, 1972). El consumo de glucosa se determinó calculando la disminución de sus niveles en los sobrenadantes celulares en comparación con los niveles en el medio de cultivo RPMI suplementado con 10% SFB libre de células. A su vez, se determinó la concentración de triglicéridos en plasma utilizando el kit *TG Color GPO/PAP AA* (Wiener, Argentina) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las lecturas de absorbancia de todos los ensayos se obtuvieron utilizando el lector *Biochrom Asys UVM 340 Microplate Reader* y su *software* asociado en el IMEX y en el Multiscan GO (Thermofisher, EE.UU.) y el *software* SkanIT en el INBIRS.

### Ensayos de PCR en tiempo real

Se realizó la extracción de ácidos ribonucleicos (ARN) total de las DCs utilizando trizol (Thermo Fisher Scientific) a 4°C. Las muestras de ARN fueron congeladas a -80°C hasta su utilización. El ADN complementario doble cadena (ADNc) se transcribió de manera inversa a partir de 1  $\mu$ g de ARN total, utilizando la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney, primers de hexámeros aleatorios y desoxirribonucleótidos (Life Technologies, CA, USA). El ADNc fue amplificado con los cebadores correspondientes para el gen de la proteína LDHA y HIF-1A. La amplificación se realizó con un detector CFX Connect (Bio-Rad), utilizando el sistema de detección de secuencia verde PCR SYBR (Bio-Rad). Los datos se analizaron mediante el programa suministrado con el detector (CFX Connect Maestro). El contenido de ARN mensajero transcrito (ARNm) se normalizó con el ARNm del factor de elongación de la traducción eucariota 1 alfa 1 (EeF1A1). La expresión génica se cuantificó utilizando el método  $\Delta\Delta$ Ct.

**Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados.**

| Gen           | Secuencia <i>Forward</i>      | Secuencia <i>Reverse</i>    |
|---------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>EeFIA1</i> | 5'-CCAAGACCCAGGCATACTTGGGA-3' | 5'-TCGGGCAAGTCCACCACTAC-3'  |
| <i>HK2</i>    | 5'-GAGCCACCACTCACCCCTACT-3'   | 5'-CCAGGCATTTCGGCAATGTG-3'  |
| <i>LDHA</i>   | 5'-TGGGAGTTCACCCATTAAGC-3'    | 5'-AGCACTCTCAACCACCTGCT-3'  |
| <i>HIF1A</i>  | 5'-ACTAGCCGAGGAAGAACTATGAA-3' | 5'-TACCCACACTGAGGTTGGTTA-3' |

Las secuencias de los *primers* fueron obtenidas de Marin Franco et. Al, 2020.

### Caracterización fenotípica por citometría de flujo

Se utilizaron mAbs marcados con FITC, PE o PerCP-Cy5.5 de los siguientes receptores de superficie celular para el análisis fenotípico de las DCs: FITC-anti-CD1a (clon HI149, eBioscience), PE-anti-DC-SIGN (clon 120507, R&D System), PerCP-Cy5.5-anti-CD86 (clon 374216, Biolegend), FITC-anti-CD83 (clon HB15e, eBioscience), PE-anti-PD-L1 (clon MIH1, BD Pharmingen), anti-hGlut1-PE (clon 202915, R&D Systems) y, en paralelo, con el correspondiente anticuerpo de control del isotipo. Se colocaron aproximadamente  $5 \times 10^5$  células en tubos de citometría y se lavaron una vez con PBS. Las células se tiñeron durante 30 min a 4°C y se lavaron dos veces. Para la determinación de HIF-1A, las DCs se permeabilizaron con metanol o tritón 0.3%, se realizó un bloqueo con PBS-BSA1% y se incubaron con PE-anti-HIF-1A (clon 546-16, Biolegend para ensayos humanos y clon 241812, R&D para murinos) durante 40 min a 4°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1X, centrifugadas y analizadas por citometría de flujo utilizando el citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) o el citómetro CyFlow Space (SysmexPartec) en el IMEX. El análisis se realizó en la población de DCs generando un *gate* de acuerdo con sus propiedades de *Forward Scatter* y *Size Scatter*. Se utilizaron controles coincidentes con el isotipo para determinar la autofluorescencia y la tinción inespecífica. El análisis se realizó utilizando el FCS Express (De Novo Software) y los resultados se expresaron como mediana de la intensidad de fluorescencia (IMF) o porcentaje de células positivas.

### Determinación de la producción de citoquinas

Se recolectaron sobrenadantes de cultivos de DCs o co-cultivos entre DCs y células T, y se determinó la producción de TNF- $\alpha$  e IL-10 empleando kits de ELISA (ELISA MAX™ Deluxe Kits de Biolegend) y de IFN- $\gamma$  e IL-17 (BD Bioscience) siguiendo las instrucciones del proveedor. El límite de detección para cada

ensayo fue de 3 pg/ml para TNF- $\alpha$  e IL-17, 6,25 pg/ml para IFN- $\gamma$  y 8 pg/ml IL-10.

### Ensayo de activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Se llevaron a cabo ensayos de activación de linfocitos con células de dadores sanos PPD<sup>+</sup> cultivando poblaciones de DCs y linfocitos T autólogos en una relación 10 a 1 DC en placas de cultivos de 96-well con fondo redondeado (Corning) por 5 días como fue detallado previamente (Balboa et al., 2016a). El número de DCs fue ajustado a las células vivas antes de iniciar los co-cultivos. Después de 5 días, los *subsets* de células T CD4<sup>+</sup> fueron identificados por inmunomarcación de acuerdo con la expresión diferencial de CCR4, CXCR3 y CCR6 de acuerdo con lo reportado previamente<sup>50</sup>: CXCR3<sup>+</sup>CCR4<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup> (Th1), CXCR3<sup>-</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> (Th2), CXCR3<sup>-</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> (Th17) y CXCR3<sup>+</sup>CCR4<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup> (Th1Th17). Los anticuerpos conjugados a fluorocromos fueron CD4-FITC (cat. 357406, Biolegend), CXCR3-PE-Cy7 (cat. 353720, Biolegend), CCR4-PerCPy5.5 (cat. 560726, BD Bioscience), CCR6-APC (cat. 560619, BD Bioscience), y CD3-APC-Cy7 (cat. 300318, Biolegend). Adicionalmente, se utilizó el colorante de viabilidad Zombie Violet (cat. 423113, Biolegend) para excluir las células muertas. Finalmente, se llevaron a cabo controles *Fluorescence Minus One* (FMO) para realizar estrategias de *gating* adecuadas para la detección de CXCR3-PE-Cy7, CCR4-PerCP-Cy5.5 y CCR6-APC. Las células fueron adquiridas por citometría de flujo usando el citómetro BD FACSCANTO (INBIRS, Buenos Aires).

### Determinación de la capacidad de quimiotaxis de las DCs en respuesta a CCL21

Se emplearon cámaras de migración (HTS Transwell, Corning, USA) compuestas por dos compartimentos separados por una membrana con poros de 5  $\mu$ m de diámetro, colocando las DCs en el compartimento superior y el agente quimioattractante CCL21 (100 ng/ml, Peprotech) en el compartimento inferior. Luego de 3h de incubación a 37°C se colectaron las células capaces de migrar a partir del compartimento inferior y se realizó su cuantificación mediante citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de células migrantes en cada caso respecto del número de células sembradas inicialmente en el compartimento superior.

### Ensayo de migración 3D en matrices

Con el fin de generar matrices de colágeno de baja densidad, se agregó Nutragen (2 mg/ml concentración final) a una mezcla de 10% v/v de MEM 10X (MEM Invitrogen, Carlsbad, CA), agua destilada, y 4-6% (v/v) de buffer bicarbonato de sodio (pH=9) 7,5%. Se colocaron 110 µl de la preparación en insertos transwell con membrana de poliéster con un tamaño de poro de 8 µm, los cuales fueron montados en placas complementarias de 24 pocillos (BD Biosciences). Se incubaron los sistemas a 37°C durante 1h para permitir la polimerización y se agregaron 800 µl de RPMI sin suero en el pocillo y 200 µl dentro de los insertos. Se incubó *overnight* a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se colocaron los insertos en pocillos que contenían 800 µl de RPMI con 10% de SFB y se sembraron 20.000 DC sobre la superficie de la matriz resuspendidas en medio RPMI con 1,5% de SFB. Transcurridas las 24h, se cuantificó la migración celular utilizando un microscopio invertido (Leica DMIRB, Leica Microsystems, Deerfield, IL) y el software Metamorph. Para esto, se tomaron imágenes automáticamente con un objetivo 10X a intervalos constantes de 30 µm y se contaron las células en la superficie y dentro de la matriz usando el *plugin* "cell counter" del software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). El porcentaje de migración fue obtenido mediante la relación entre las células dentro de la matriz y el total de células contadas. Alternativamente, se procedió de forma similar a la descrita previamente (Cougoule et al., 2018) utilizando colágeno (Sigma, C9791-10MG). Luego de transcurridas las 24h de migración celular dentro de las matrices, se removió el medio dentro de los insertos y se realizaron 2 lavados con PBS 1X. Las matrices se fijaron con PFA 4% durante 30 min a temperatura ambiente y se marcaron con DAPI (Cell signaling). Se retiró la matriz del interior de los insertos y se montaron las membranas en portaobjetos utilizando medio de montaje DAKO. Se tomaron imágenes aleatoriamente con un objetivo 20X con el microscopio confocal FluoView FV1000 y se contaron las células por campo.

### Ensayo de migración in vivo

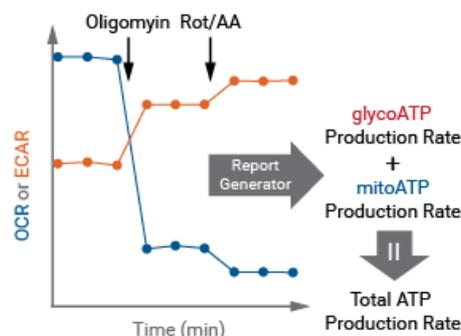
Las BMDC se diferenciaron a partir de precursores de médula ósea obtenidos de ratones BALB/c vírgenes en presencia de GM-CSF murino (10 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml), ambos de Biolegend, durante 7 días. Tras la diferenciación, las DCs se trataron con OX (20 mM) o PX-478 (10 µM) y se estimularon con iMtb. Después de 24h, las DC se tiñeron con CFSE (5 µM) y se inocularon intradérmicamente en la zona inguinal de ratones BALB/c *naive*. Tres horas después de la inyección, se recogieron los ganglios linfáticos inguinales cercanos al lugar de inoculación y se tiñeron las células con anticuerpo conjugado con fluoróforo PE-anti-CD11c (clon HL3, BD

Pharmingén). El análisis se realizó con el programa informático FlowJo y los resultados se expresaron como porcentaje de células CFSE<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>. Alternativamente, BMDC de ratones C57/6 se infectaron con la cepa vacunal Bacillus Calmette Guerin (BCG) y se trataron o no con PX-478. Las células tratadas con PX-478 fueron teñidas con el colorante *cell trace violet* (CTV, Molecular Probes) y las no tratadas con CFSE. Se generó una mezcla con cantidad equivalente de células de cada condición experimental, y se inoculó en ratones C57/6 vírgenes de forma intradérmica. Al cabo de 3h, se recolectaron los ganglios linfáticos inguinales y las células se marcaron y analizaron por citometría de flujo.

### Estimación de la respiración celular mediante oximetría con el analizador de flujo extracelular Seahorse

Se determinó la producción total de ATP cuantificando la tasa de producción de ATP de la glicólisis y la fosforilación oxidativa utilizando el analizador de flujo extracelular XFe24 (Agilent, Bioscience, EE.UU.). Con este fin, se cultivaron DCs a una densidad celular de  $2 \times 10^5$  células/well. Se realizaron 3 mediciones consecutivas bajo condiciones basales y luego se añadió secuencialmente oligomicina y rotenona/antimicina A (Agilent, EE.UU.). La tasa de producción de ATP mitocondrial fue determinada en base al descenso de la tasa de consumo de oxígeno luego de la adición de oligomicina. Por otro lado, la completa inhibición de la respiración mitocondrial con rotenona/antimicina A, permitió calcular la acidificación asociada a la mitocondria, y combinado con los datos de la tasa de flujo de protones, se calculó la tasa de producción de ATP asociada a la glicólisis. Para el análisis de los datos se empleó el Seahorse Wave software.

Agilent Seahorse XF Real-Time ATP Rate Assay



**Figura 7. Esquema representativo del perfil cinético de las mediciones de OCR y ECAR en un ensayo de tasa de producción de ATP en tiempo real.**

### Evaluación del rol de los TLRs

Se evaluó el efecto del bloqueo de receptores de reconocimiento de patrones asociados a patógenos: TLR2 y TLR4. Para ello, se añadió a los cultivos de DCs anticuerpos neutralizantes específicos para TLR2 (1 µg/ml, clon TL2.1, BioLegend) o TLR4 (1 µg/ml, clon HTA125, BioLegend) 1h antes de la estimulación con Mtb viable o iMtb. A las 24 h, se recolectaron los sobrenadantes para medir lactato y glucosa, según lo previamente detallado. Como control de especificidad para TLR2 y control positivo para TLR4, se emplearon DCs estimuladas con LPS (10 ng/ml, agonista de TLR4), en presencia de los anticuerpos neutralizantes para TLR2 o de TLR4. Finalmente, con el fin de evaluar el rol de TLR2 en la inducción de la glicólisis, se estimularon DCs con los agonistas de TLR2, Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (20 o 100 ng/ml) o peptidoglicano (PTG) (0,1 a 5 ug/ml).

### Evaluación del impacto de la modulación de HIF-1A y de la actividad de glicolítica de las DCs

Con el fin de incrementar la actividad de HIF-1A de las DCs se empleó la droga dimetil-oxalil-glicina (DMOG, Santa Cruz, USA). Por el contrario, para atenuarla, se empleó PX-478 (Sigma). Para inhibir la glicólisis, se empleó OX (Sigma). Las dosis óptimas para cada una de estas drogas fueron previamente determinadas basándose en criterios de toxicidad e impacto en la producción de lactato, definiéndose 50 µM para DMOG, 20 µM para PX-478 y 20 mM para OX. Las DCs fueron pre-incubadas con las drogas en dosis correspondientes y estimuladas o no con Mtb por 24h.

### Determinación del metabolismo de las DCs por el método SCENITH

SCENITH es un método basado en el análisis de la síntesis proteica por citometría de flujo en presencia de los inhibidores metabólicos oligomicina, inhibidor de la respiración mitocondrial, y 2-deoxi-glucosa, un inhibidor tanto de la glicólisis como la respiración mitocondrial (Argüello et al., 2020). Para llevar a cabo esta técnica, se incubaron  $1,25 \times 10^6$  DCs durante 40 min a 37°C al 5% CO<sub>2</sub> con las diferentes drogas y puromicina. Posteriormente las células se fijaron con PFA 1% durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un lavado con buffer de permeabilización y se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-puromicina-FITC durante 1h a 4°C. Finalmente, las células se adquirieron en el citómetro (FACSCalibur).

### Determinación de masa mitocondrial por citometría de flujo

Con el fin de determinar la masa mitocondrial, se colocaron  $2,50 \times 10^6$  en medio RPMI sin suero, y se incubaron con MitoSpy Green FM 250nM (Biolegend) durante 30 min a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, las células se lavaron y se midió la emisión de fluorescencia mediante citometría de flujo (FACSCalibur).

### Análisis de la morfología mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión

Se fijaron las DCs con 2.5% glutaraldehído y 2% PFA (EMS, Delta-Microscopies) disuelto en Sorensen buffer (pH 7.2) 0.1M durante 1h a temperatura ambiente. Luego, las células fueron preservadas en PFA 1% disuelto en buffer Sorensen. Posteriormente, las células adherentes fueron tratadas por 1h con uranil acetato 1%, deshidratadas en series de etanol graduado y embebidas en Epon. Se cortaron secciones con un microtomo (Leica Ultracut) y se montaron en grillas de cobre activadas con carbón. Finalmente, se tiñeron las secciones con uranil acetato 1% y citrato, y fueron examinadas con un microscopio electrónico de transmisión (Jeol JEM-1400) a 80 kV en Toulouse, Francia. Se adquirieron imágenes utilizando una cámara digital (Gatan Orius).

### Análisis de enriquecimiento de monocitos humanos

Para llevar a cabo el análisis de enriquecimiento de monocitos de pacientes con TB, se reanalizó datos de transcriptómica de este tipo celular previamente publicados (GEO, código de acceso: GSE185372). Brevemente, se separaron por *sorting* las poblaciones de monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) y no clásicos (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) de PBMCs criopreservados de individuos con TB activa, TB latente (IGRA<sup>+</sup>) e individuos sanos (IGRA<sup>-</sup>) y se llevó a cabo secuenciación del ARN. El análisis de enriquecimiento se llevó a cabo utilizando la herramienta "BubbleMap". BubbleMap permite integrar múltiples análisis de enriquecimiento en un único gráfico y establecer comparaciones entre distintos análisis. Este análisis se realizó con un valor permutación de 1000 set de genes y con "Signal2Noise" como métrica para generar un ranking de genes. Los resultados se muestran como un gráfico de burbujas, donde cada burbuja es el resultado de un análisis de enriquecimiento de set de genes (GSEA) y resume la información de su correspondiente gráfico de enriquecimiento. El color de cada burbuja corresponde a la población de la comparación pareada en la cual el set de genes se encuentra enriquecido. El área de cada burbuja es proporcional al puntaje de enriquecimiento normalizado (NES) del GSEA. La intensidad del color corresponde a la significancia estadística del enriquecimiento, derivado

de computar el *pvalue* usando la corrección Benjamini-Yekutieli. Los enriquecimientos con una significancia estadística por arriba de 0.30 se encuentran representados por círculos vacíos.

## Capítulo II

### Cepa vacunal BCG

La cepa vacunal BCG fue crecida a 37°C en agitación en medio Middlebrook 7H10 (HIMEDIA) suplementado con suplementado con 10% v/v oleato-albúmina-dextrosa-catalasa (Difco) 0.05% v/v de Tween-80 (Sigma-Aldrich) y 0.2% v/v de glicerol.

### Preparación de DCs derivadas de médula ósea (BMDC)

Ratones C57BL/6 hembras de entre 4 a 6 semanas de edad se anestesiaron con isoflurano, y se sacrificaron por dislocación cervical. Se disectaron las tibias y fémures de cada ratón y se aislaron los precursores de médula ósea, los cuales se cultivaron en placas de Petri con medio RPMI 10% SFB,  $\beta$ -mercaptoetanol ( $5,5 \times 10^{-7} M$ ), GM-CSF (10ng/ml) e IL-4 (10ng/ml) murino. Al día 5-6 de diferenciación, se recolectaron las BMDC en suspensión de cada placa.

### Transferencia adoptiva de BMDC a ratones

Se prepararon BMDC de ratones vírgenes, y se infectaron con BCG con una multiplicidad de infección 1:1 en presencia o no de PX-478. Luego de 24h, se inocularon  $1 \times 10^6$  BMDC por vía subcutánea en el pliegue dorsal del cuello de ratones C57BL/6.

### Determinación de células T productoras de IFN- $\gamma$

Se realizó una transferencia adoptiva de BMDC infectadas con BCG y tratadas o no con PX-478 a ratones C57BL/6 vírgenes. Al cabo de 7, 19 o 30 días post inoculación, se recolectaron los ganglios cervicales y los bazo de cada ratón y se disgregaron mecánicamente. Se estimularon durante 24h  $1 \times 10^6$  esplenocitos o células de ganglio en placas de 96 pocillos de fondo en U con derivado proteico purificado (PPD), que consiste de un precipitado de moléculas no específicas de especie de filtrados de cultivos esterilizados de

organismos tuberculoideos. Durante las últimas 5h, se añadió brefeldina (1 $\mu$ g/ml, Biolegend). Las células provenientes de ambos tejidos se marcaron con anti-CD3 FITC (Biolegend, clon 17A2) y anti-CD4 PE (Biolegend, clon GK1.5) durante 25 min a 4°C y fueron fijadas con PFA 1%. Posteriormente se permeabilizaron las células con buffer de permeabilización 10X (Invitrogen) y se incubaron durante 1h a 4°C con anti-IFN- $\gamma$  PE/Cy7 (Biolegend, clon XMG1.2). Se emplearon controles FMO. Las células fueron adquiridas en el citómetro CyFlow Space (SysmexPartec). El análisis se realizó utilizando el software FlowJo V.10.

### Capítulo III

#### Generación de pools de plasma

Plasmas de pacientes con TB o de donadores sanos se recolectaron mediante centrifugación de la sangre a 300g durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, alícuotas de plasma fueron centrifugadas a 12000g durante 10 min a 4°C para eliminar debris remanente. Se generaron pools de plasma de pacientes con TB (pTB) o donadores sanos (pHS) mezclando volúmenes equivalentes de plasmas heterólogos de 6 donadores individuales utilizando como criterio de selección la capacidad glicolítica de los monocitos de cada donador. Cada pool fue deplegado por incubación en baño térmico a 56°C durante 30 min. Para algunos ensayos, se depletó el pool generado a partir de pacientes con TB de IgG total mediante la incubación con beads sefarosa-proteína G durante 1h a 4°C ( $\Delta$ IgG-pTB).

#### Tratamiento de monocitos

Con el fin de evitar citotoxicidad producto del uso de plasmas heterólogos, se purificaron monocitos provenientes de *buffy coats* y se incubaron con los distintos pools de plasma durante 1h. La viabilidad de los monocitos expuestos a los pools fue evaluada mediante el uso del colorante de viabilidad Zombie Violet (cat. 423113, Biolegend) por citometría de flujo.

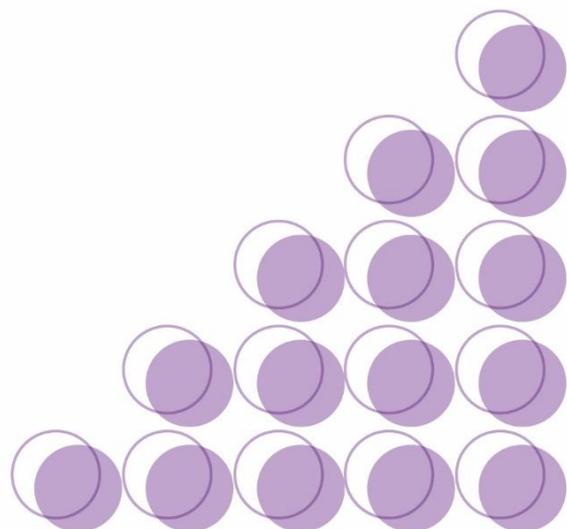
#### Análisis estadístico

Se definió ensayo independiente como cada experimento realizado con células diferentes donantes. Los valores se expresaron como el valor de la media con su error estándar (SEM) de un número de experimentos

## **Materiales y métodos**

independientes. Los grupos de datos fueron pareados y sometidos a pruebas de normalidad. En caso de no superar dichas pruebas se aplicaron pruebas no paramétricas. Para el caso de pruebas no paramétricas, la comparación entre más de dos grupos de datos pareados se realizó utilizando la prueba de Friedman, seguida de las Comparaciones de Dunn; mientras que entre dos condiciones experimentales pareadas se realizó mediante la prueba de dos colas de Wilcoxon. Para los grupos de datos que presentaron una distribución paramétrica la comparación entre más de dos grupos de datos pareados se realizó utilizando la prueba ANOVA, seguida de las Comparaciones de Bonferroni; mientras que entre dos condiciones experimentales pareadas se realizó mediante la prueba T de dos colas. Para las comparaciones estadísticas, se consideró un valor de  $p < 0,05$  como significativo.

# RESULTADOS



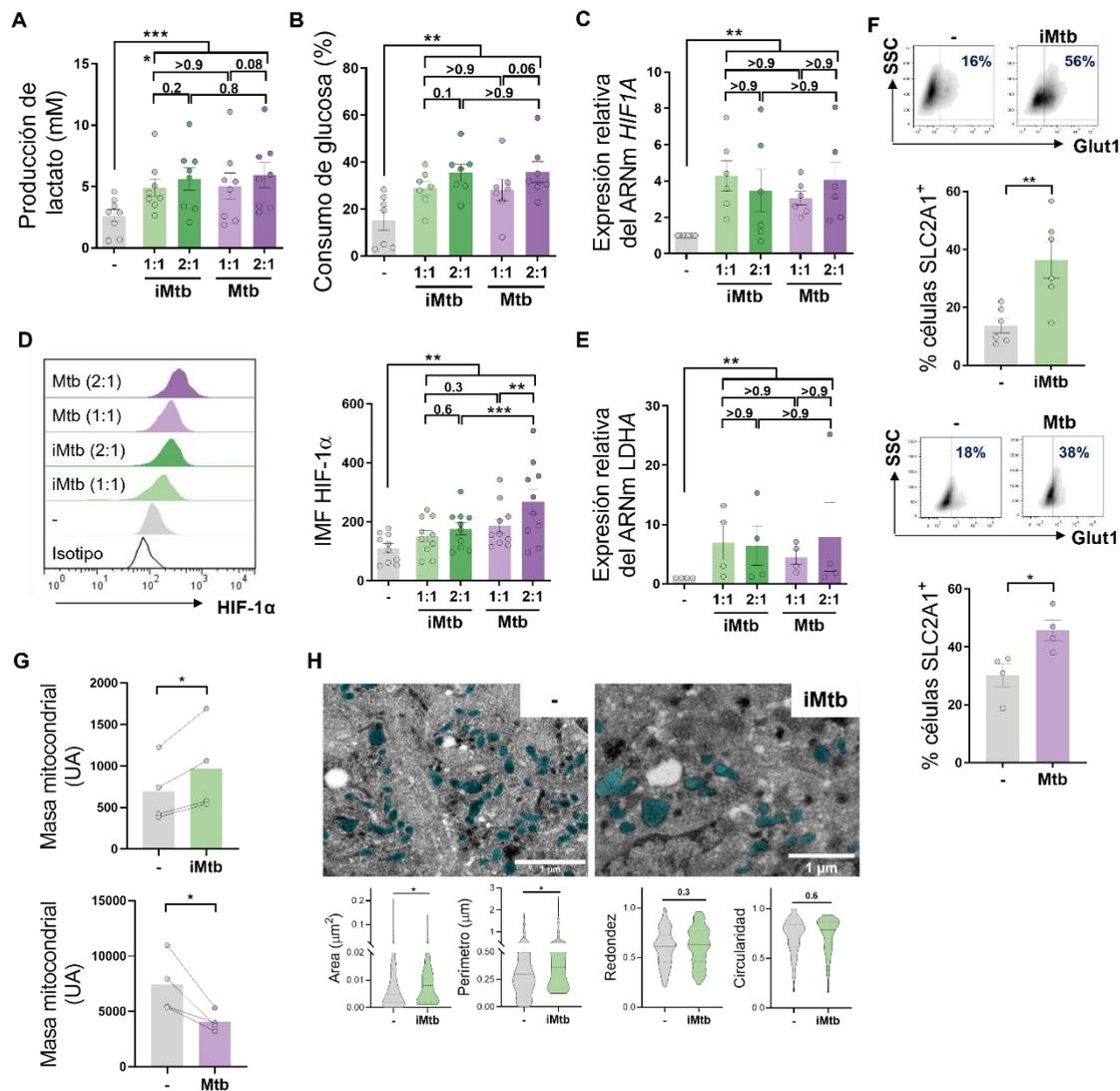
## RESULTADOS

### Capítulo I: estudio de las alteraciones metabólicas que sufren las Mo-DCs durante la infección con Mtb

#### Mtb afecta al metabolismo de las DCs humanas derivadas de monocitos

Para determinar el impacto de Mtb en el metabolismo de las Mo-DCs, evaluamos los parámetros metabólicos asociados con la glicólisis y los cambios mitocondriales tras la estimulación o la infección por Mtb. Las células que llevan a cabo glicólisis aeróbica se caracterizan por un mayor consumo de glucosa junto con la producción y liberación de lactato en presencia de oxígeno. Al medir la liberación de lactato y el consumo de glucosa en Mo-DCs estimuladas durante 24 h con dosis equivalentes de iMtb o Mtb viable, encontramos que las DCs tratadas con tanto iMtb como Mtb viable liberaron mayores niveles de lactato y consumieron más glucosa que las DCs no estimuladas (**Figura 8A y B**). De forma coherente, tanto el tratamiento con iMtb como la infección por Mtb produjeron un aumento de la expresión de HIF1A, regulador clave para la activación de la glicólisis, tanto a nivel de ARNm como de proteínas (**Figura 8C y D**). La expresión del gen que codifica la enzima glicolítica LDHA, que cataliza la conversión de lactato en piruvato, también aumentó en las DCs tratadas con iMtb o infectadas con Mtb (**Figura 8E**). En línea con la adopción de un perfil glicolítico, las DCs estimuladas con iMtb o infectadas con Mtb viable presentaron una mayor expresión del transportador de glucosa SLC2A1 (GLUT1) (Freemerman et al., 2014; **Figura 8F**). Cabe destacar que LDHA y GLUT1 son genes diana de HIF1A, y su regulación al alza se correlacionó con el aumento de la expresión de HIF1A tras la estimulación por Mtb.

Para evaluar los cambios mitocondriales, medimos la masa mitocondrial y la morfología. Encontramos una mayor masa mitocondrial, así como mitocondrias de mayor tamaño en las DCs estimuladas con iMtb en comparación con las DCs no tratadas (**Figura 8G y H**). En contraste con los resultados obtenidos tras la estimulación con iMtb, las DCs infectadas con Mtb mostraron una reducción de su masa mitocondrial (**Figura 8G**). Este hallazgo indica que, aunque tanto las DCs infectadas por Mtb como las expuestas a iMtb muestran un claro aumento de su actividad glicolítica, se observan respuestas divergentes en términos de masa mitocondrial. Por lo tanto, estos resultados indican que **Mtb afecta al metabolismo de las Mo-DCs, provocando cambios mitocondriales y potenciando fundamentalmente la vía glicolítica.**



**Figura 8. *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) reconfigura la red metabólica de las células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DCs).**

Mo-DCs fueron estimuladas con *Mtb* en su forma viable o irradiada a 2 multiplicidades de infección (1 o 2 *Mtb* por DCs) por 24 h. La glicólisis fue medida como **(A)** producción de lactato en sobrenadantes de cultivo (N=8); **(B)** consumo de glucosa determinado en sobrenadantes de cultivo (N=7); **(C)** expresión relativa de ARNm de HIF1A normalizada con respecto al gen de control *EEF1A1* (N = 6). **(D)** Histogramas representativos de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de HIF1A medida por citometría de flujo. La cuantificación se muestra en el gráfico de la derecha (N=10). **(E)** Expresión relativa del ARNm de la lactato deshidrogenasa A (LDHA) normalizada con respecto al gen de control *EEF1A1* (N=4). **(F)** Los gráficos de densidad muestran el porcentaje de células Glut1<sup>+</sup> (SLC2A1) con y sin estimulación con iMtb o infectadas con *Mtb* viable en un experimento representativo. La cuantificación de células Glut1<sup>+</sup> se muestra a continuación (N=4-6). **(G)** IMF de la sonda Mitospy como medida de la masa mitocondrial para Mo-DCs tratadas (o no) con iMtb (panel superior) o infectadas con *Mtb* viable (panel inferior). Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa a un único individuo; se muestran las medias ± SEM (N = 4). **(H)** Micrografías representativas por microscopía electrónica de transmisión de DCs control (-) y estimuladas con iMtb (iMtb) que muestran las mitocondrias coloreadas en cian (paneles superiores) y análisis morfométrico

cuantificado (paneles inferiores) (N = 4). La significación estadística se evaluó en **(A-E)** mediante ANOVA de 2 factores seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ), y en **(F-H)** mediante la prueba T pareada (\* $p < 0,05$ ) para iMtb o Mtb frente a controles. Todos los valores se expresan como media  $\pm$  SEM.

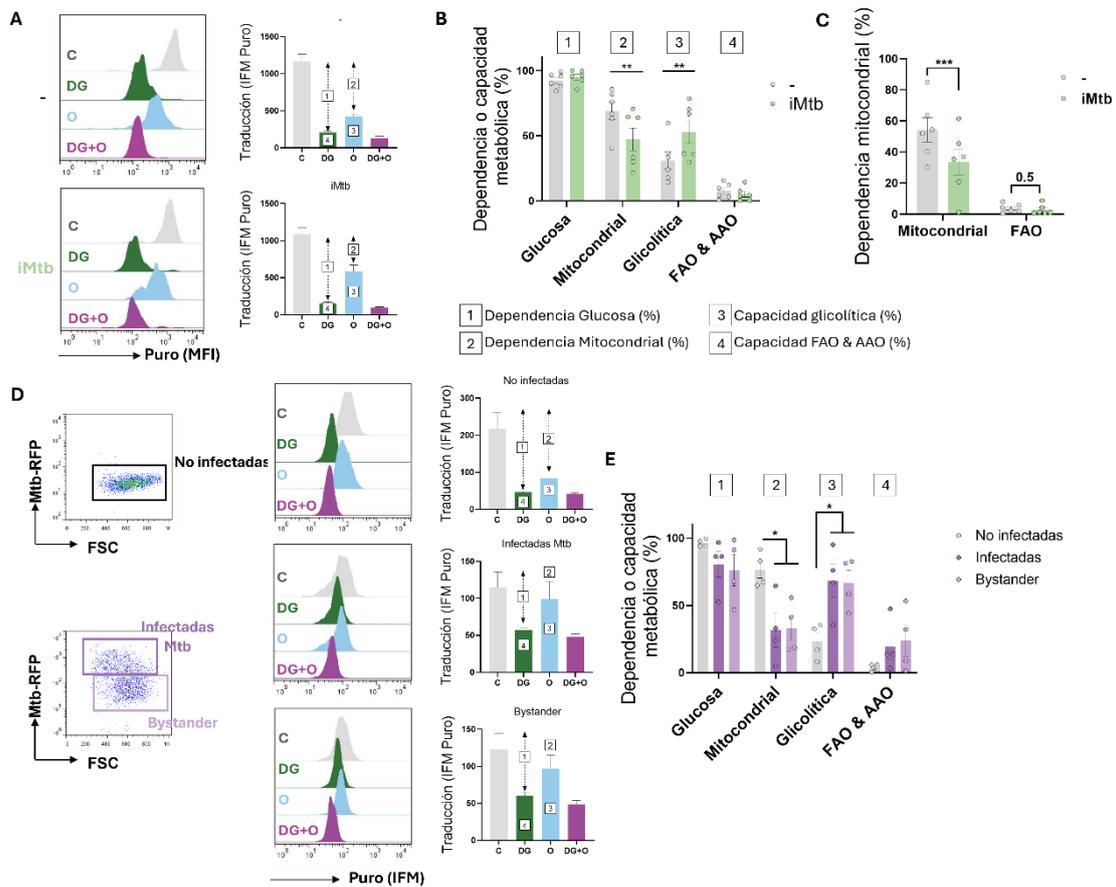
### La exposición a Mtb induce preferencialmente un metabolismo glicolítico en las DCs

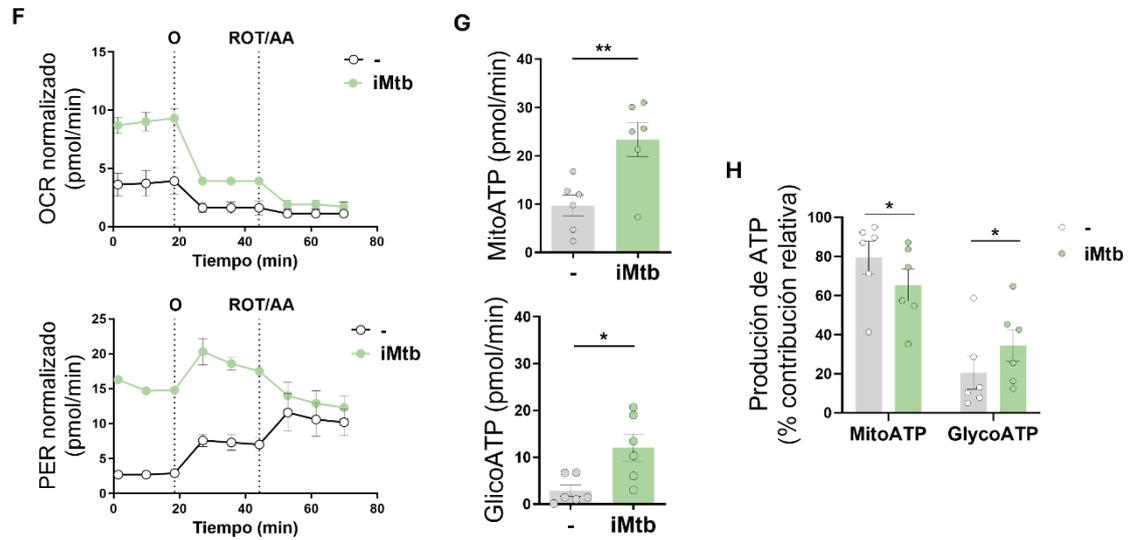
Para profundizar en la caracterización del perfil metabólico de las DCs tras la estimulación con iMtb o la infección con Mtb, evaluamos el metabolismo de las DCs a nivel de células únicas utilizando la tecnología SCENITH (Argüello et al., 2020). Este método se basa en la estimación de cambios en los niveles de ATP a través de la medición de cambios en la síntesis de proteínas siendo que ambos procesos presentan una cinética similar (Argüello et al., 2020). Tratando las células con inhibidores del metabolismo de la glucosa o de la respiración mitocondrial, y midiendo su impacto en la síntesis de proteínas mediante la incorporación de puromicina por citometría de flujo, se pueden cuantificar las dependencias del metabolismo de la glucosa y mitocondrial respectivamente. También se pueden calcular otros dos parámetros derivados, como la “capacidad glicolítica” y la “capacidad de oxidación de ácidos grasos y aminoácidos (FAO y AAO)”. Mediante la implementación de la tecnología SCENITH, determinamos una menor dependencia de la OXPHOS en paralelo con un aumento de la capacidad glicolítica en las DCs estimuladas por iMtb (**Figura 9A y B**). Adicionalmente, no encontramos diferencias en la dependencia de la FAO y AAO entre DCs estimuladas con iMtb y sus células control (**Figura 9A y B**). A fin de poder estimar las contribuciones entre FAO y AAO por separado, incorporamos el uso de un inhibidor específico de la FAO, etomoxir, al protocolo de SCENITH. No obtuvimos diferencias significativas en las dependencias de la FAO entre DCs estimuladas con iMtb y sus células control (**Figura 9C**). De forma similar, observamos que, tanto las DCs infectadas como las *bystander*, presentaron un aumento en la capacidad glicolítica (**Figura 9D y E**). Dado que las DCs *bystander* no están en asociación directa con Mtb (Mtb-RFP-DCs), estos hallazgos sugieren que los mediadores solubles inducidos en respuesta a la infección podrían ser suficientes para desencadenar la glicólisis incluso en células no infectadas. Al igual que en el caso de DCs estimuladas con iMtb, no observamos diferencias significativas en cuanto a la dependencia de la glucosa y la capacidad de FAO y AAO entre los grupos de DCs control, infectadas y *bystander* (**Figura 9A-E**).

En el caso de las DCs estimuladas con iMtb, también evaluamos las tasas intracelulares de producción de ATP de origen glicolítico y mitocondrial mediante la tecnología Seahorse. Los perfiles bioenergéticos revelaron que

## Resultados

iMtb aumenta la tasa de protones extruidos a lo largo del tiempo, o tasa de eflujo de protones (PER), así como la tasa basal de consumo de oxígeno (OCR) en las Mo-DCs (**Figura 9F**). Las mediciones de la tasa de acidificación extracelular basal (ECAR) y la OCR se utilizaron para calcular la tasa de producción de ATP a partir de la glicólisis (GlycoATP) y la OXPHOS mitocondrial (MitoATP). Las tasas de producción de ATP tanto de la glicólisis como de la respiración mitocondrial aumentaron tras la estimulación con iMtb (**Figura 9G**). Estos resultados están en línea con los incrementos en los parámetros glicolíticos, de la masa y tamaños mitocondriales previamente descritos para las DCs estimuladas con iMtb. En forma complementaria, tras el análisis de las contribuciones relativas, observamos que la contribución de GlycoATP aumenta, mientras que la contribución de MitoATP disminuye en las DCs estimuladas con iMtb (**Figura 9H**), lo cual condice con los resultados generados mediante SCENITH. Estos resultados confirman el cambio en el metabolismo de las DCs inducido por Mtb, con un aumento de la contribución glicolítica relativa al metabolismo global a expensas de la vía OXPHOS. En conjunto, los perfiles metabólicos indican que **en las Mo-DCs expuestas a Mtb se produce un cambio metabólico hacia la glicólisis aeróbica**.





**Figura 9. *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) desvía el metabolismo de las células hacia la glicólisis.**

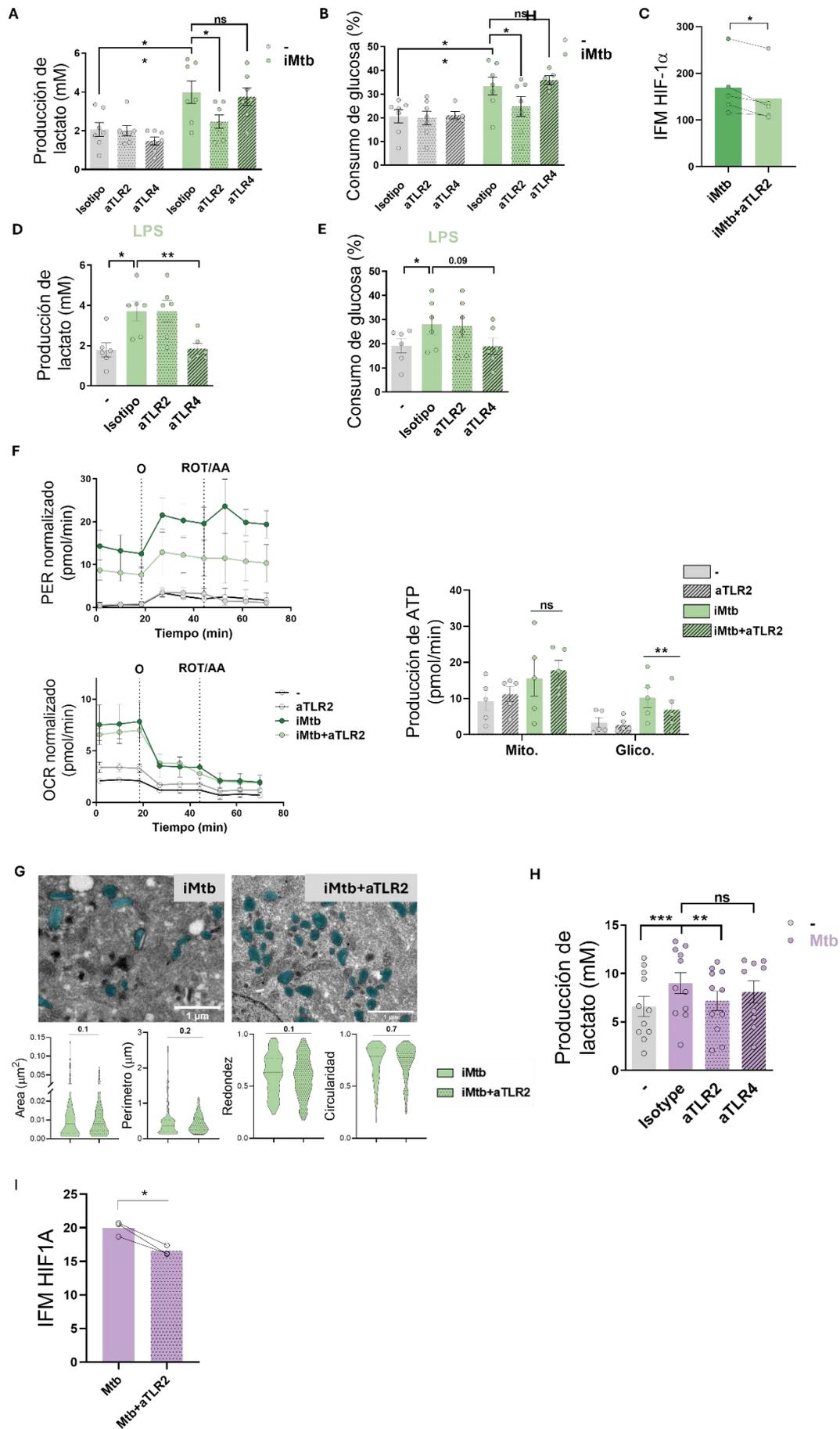
Las DCs derivadas de monocitos (Mo-DCs) fueron estimuladas con Mtb irradiada (iMtb) o infectadas con Mtb expresando proteína roja fluorescente (Mtb-RFP, panel D). **(A)** Histogramas representativos que muestran el nivel de traducción tras la incorporación de puromicina (Puro) y la tinción con un anti-Puro monoclonal (intensidad de fluorescencia media [IFM] anti-Puro) en respuesta al tratamiento con inhibidores (C, control; DG, 2-deoxi-d-glucosa; oligomicina, O; o tratamiento combinado, DG + O). Los gráficos de barras muestran los valores de la IFM anti-Puro de seis donantes. Las flechas y los números dentro de los recuadros denotan las diferencias entre la IFM de Puro en los distintos tratamientos que se utilizan para calcular la dependencia de la glucosa (1) y la capacidad de oxidación de ácidos grasos y aminoácidos (FAO y AAO) (4); y la dependencia mitocondrial (2) y la capacidad glicolítica (3). **(B)** Contribuciones relativas de las capacidades glicolítica y FAO y AAO y de las dependencias de la glucosa y mitocondrial al metabolismo global de las DCs analizadas con SCENITH (N = 6). **(C)** Contribuciones relativas de las dependencias mitocondrial y FAO al metabolismo general de las DCs analizadas con SCENITH en DCs expuestas o no a iMtb cuando el inhibidor de la FAO, etomoxir, fue usado (N = 6). **(D, E)** Las DCs fueron infectadas con Mtb-RFP durante 24 hrs., luego el perfil metabólico fue evaluado por SCENITH. **(D)** Se muestran histogramas representativos del nivel de traducción tras la incorporación de Puro para DCs no infectadas, infectadas por Mtb y *bystander* (aquellas células del cultivo infectado que no están en contacto directo con Mtb). Los gráficos de barras muestran los valores de la IFM anti-Puro de cuatro donantes. El panel derecho muestra gráficos representativos que muestran la estrategia de separación para distinguir las poblaciones dentro de los cultivos infectados por Mtb, que incluye células RFP+ (DCs infectadas por Mtb) y RFP- (*bystander* DCs). **(E)** Contribuciones relativas de las capacidades glicolíticas y FAO y AAO y dependencias de glucosa y mitocondriales al metabolismo de las DCs (N = 4). **(F)** Perfil cinético de las mediciones de la tasa de eflujo de protones (PER; panel inferior) y de la tasa de consumo de oxígeno (OCR; panel superior) en DCs control y estimuladas con iMtb en respuesta a tratamientos con inhibidores (oligomicina, O; ROT/AA, rotenona/antimicina A), obtenidos utilizando un analizador Agilent Seahorse XFe24. Las mediciones de PER y OCR se normalizaron con respecto al área cubierta por células. **(G)** Tasa de producción de ATP a partir de la fosforilación oxidativa mitocondrial (MitoATP) y la glicólisis (glycoATP). La tasa de producción de MitoATP y la tasa de producción de glycoATP se calcularon

a partir de mediciones de OCR y ECAR en DC de control y estimuladas con iMtb (N = 6). **(H)** Porcentajes de MitoATP y GlicoATP en relación con la producción total de ATP (N = 6). Las estadísticas de **(B-C, G-H)** proceden de pruebas T pareadas (\*p<0,05; \*\*p<0,01) para iMtb frente a controles. Las estadísticas de **(E)** son ANOVA de dos vías seguidas de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\*p<0,05), como se muestra en las líneas. Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa DCs de un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

### Mtb activa la vía glicolítica a través de su interacción con TLR2

Dado que el Mtb es detectado principalmente por los TLR2 y 4 (Quesniaux et al., 2004), investigamos la contribución de estos receptores a la activación de la glicólisis observada en Mo-DCs tras la estimulación por Mtb. Utilizando anticuerpos neutralizantes específicos para estos receptores, encontramos que la señalización vía TLR2, a diferencia de la de TLR4, es necesaria para activar la vía glicolítica, lo cual puede evidenciarse por la disminución de la liberación de lactato, el consumo de glucosa y la expresión de HIF1A en las DCs estimuladas por Mtb en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-TLR2 (**Figura 10A-C**). La liberación de lactato y el consumo de glucosa fueron abolidos en DCs estimuladas con LPS en presencia de anticuerpos neutralizantes contra TLR4, pero no contra TLR2 (**Figura 10D-E**), en línea con el hecho de que TLR4 actúa como receptor de reconocimiento para el LPS (Chow et al., 1999). Además, el bloqueo de TLR2 también disminuyó la producción de ATP glicolítico en DCs estimuladas con iMtb sin alterar la producción de ATP asociada a OXPHOS (**Figura 10F**) o el tamaño y la morfología de las mitocondrias (**Figura 10G**), lo que sugiere que la participación de TLR2 por iMtb es necesaria para la inducción de la glicólisis, pero no la respiración mitocondrial. De forma notoria, el reconocimiento de Mtb mediado por TLR2 también fue necesario para la liberación de lactato y la regulación al alza de HIF1A desencadenada por Mtb viable (**Figura 10H e I**).

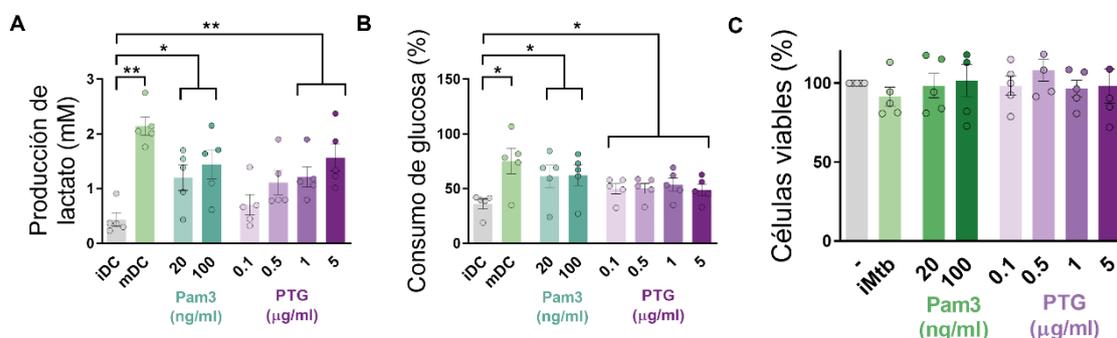
# Resultados



**Figura 10. *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) desencadena la glicólisis a través de de TLR2 en células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DCs).**

Las Mo-DCs fueron estimuladas con Mtb irradiado (iMtb) en presencia de anticuerpos neutralizantes contra TLR2 ( $\alpha$ TLR2), TLR4 ( $\alpha$ TLR4), o sus respectivos controles de isotipo. **(A)** Liberación de lactato medida en el sobrenadante de cultivo (N = 7). **(B)** Consumo de glucosa medida en el sobrenadante (N = 7). **(C)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) de HIF1A medida por citometría de flujo (N = 4). **(D, E)** Las Mo-DCs fueron estimuladas o no con LPS en presencia de anticuerpos neutralizantes contra TLR2 ( $\alpha$ TLR2) o TLR4 ( $\alpha$ TLR4). **(D)** Liberación de lactato medida en el sobrenadante (N = 6). **(E)** Captación de glucosa medida en el sobrenadante (N = 6). **(F)** Perfil cinético de la tasa de eflujo de protones (PER) y la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (paneles de la izquierda). El análisis del flujo metabólico muestra la cuantificación de la producción mitocondrial de ATP y la producción glicolítica de ATP (panel derecho) (N = 5). **(G)** Análisis morfométrico de las mitocondrias de las Mo-DCs estimuladas o no con iMtb en presencia de  $\alpha$ TLR2 (N = 4). **(H, I)** Las Mo-DCs fueron infectadas o no con Mtb en presencia de  $\alpha$ TLR2 o  $\alpha$ TLR4. **(H)** Liberación de lactato medida en el sobrenadante (N = 11). **(I)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) de HIF1A medida por citometría de flujo (N = 3). Las estadísticas de **(A-B, D-E, H)** son ANOVA de dos vías seguidas de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Las estadísticas de **(C, F-G, I)** proceden de pruebas T pareadas (\* $p < 0,05$ ) para iMtb o Mtb frente a controles. Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa DCs de un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

Para reconfirmar la implicación de TLR2 en la inducción de la glicólisis, probamos el efecto de agonistas de TLR2 sintéticos (Pam3CSK4) o Ags micobacterianos (como el peptidoglicano, PTG) (Schwandner et al., 1999; Underhill et al., 1999) y encontramos que ambos ligandos fueron capaces de inducir la liberación de lactato y el consumo de glucosa en las DCs (**Figura 11A y B**), sin afectar a la viabilidad celular (**Figura 11C**). Por lo tanto, nuestros datos indican que **Mtb induce la glicólisis en las Mo-DCs a través de la participación de TLR2.**



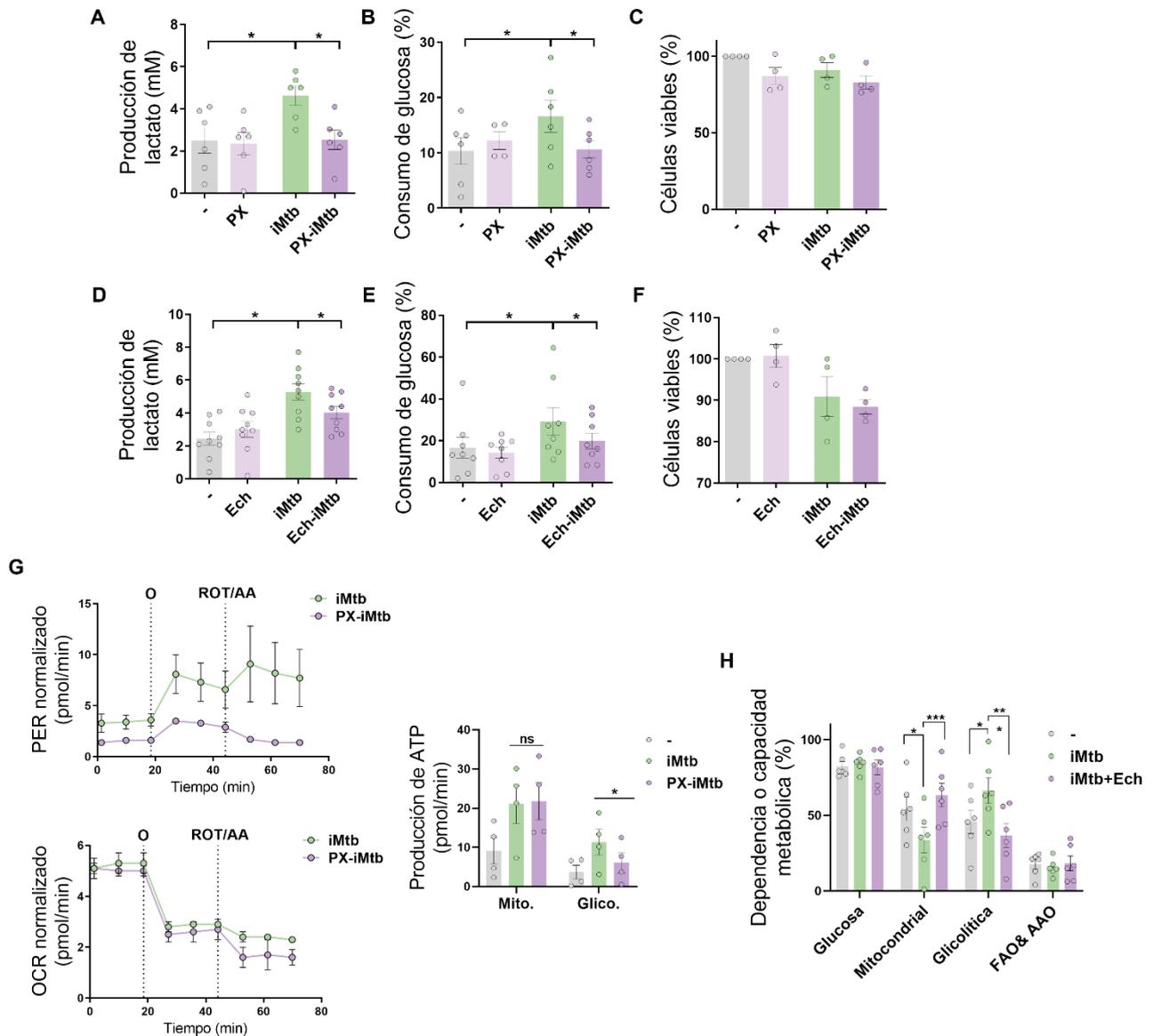
**Figura 11. La unión de TLR2 gatilla la glicólisis en Mo-DCs.**

**(A, C)** Las Mo-DCs fueron estimuladas con Pam3Cys o peptidoglicano de Mtb (PTG) a las concentraciones indicadas. **(A)** Liberación de lactato medida en el sobrenadante (N = 5). **(B)**

Consumo de glucosa medida en el sobrenadante (N = 5). **(C)** Porcentaje de células viables estimuladas con diferentes dosis de Pam3Cys, o PTG en relación con las DCs no tratadas (N =5). **(A-C)** ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\*p<0,05; \*\*p<0,01), como se muestra en las líneas. Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa DCs de un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

### **HIF1A es necesario para la maduración de las DCs tras la estimulación con iMtb, pero no para la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

Para determinar el impacto de la glicólisis en la maduración de las DCs y la capacidad de activar células T, inhibimos la actividad de HIF1A en DCs estimuladas con iMtb empleando dos inhibidores de HIF1A que presentan mecanismos de acción diferentes. El primero es el PX-478 (PX), que reduce los niveles de HIF1A mediante la inhibición de la deubiquitinación de HIF1A, disminuye la expresión de ARNm de HIF1A y reduce la traducción de HIF1A (Koh et al., 2008); el segundo es Ech, que inhibe la unión de HIF1A al elemento de respuesta a la hipoxia, bloqueando así la capacidad de unión de HIF1A al ADN (Cairns et al., 2007; Kong et al., 2005). El tratamiento con los inhibidor de HIF1A PX o Ech disminuyó la liberación de lactato y el consumo de glucosa en las DCs estimuladas con iMtb, sin afectar a la viabilidad celular a la concentración indicada (**Figura 12A-F**). La inhibición de HIF1A mediante PX abolió significativamente la producción de ATP asociada a la glicólisis sin afectar a los niveles absolutos de producción de ATP derivado de la OXPHOS en las DCs estimuladas con iMtb (**Figura 12G**). En línea con estos resultados, la capacidad glicolítica se redujo en las DCs estimuladas con iMtb tratadas con Ech (**Figura 12H**). Por ende, **ambos inhibidores de HIF1A demostraron ser suficientes para impedir la reconfiguración metabólica hacia la glicólisis que sufren las Mo-DCs frente a la estimulación por iMtb.**



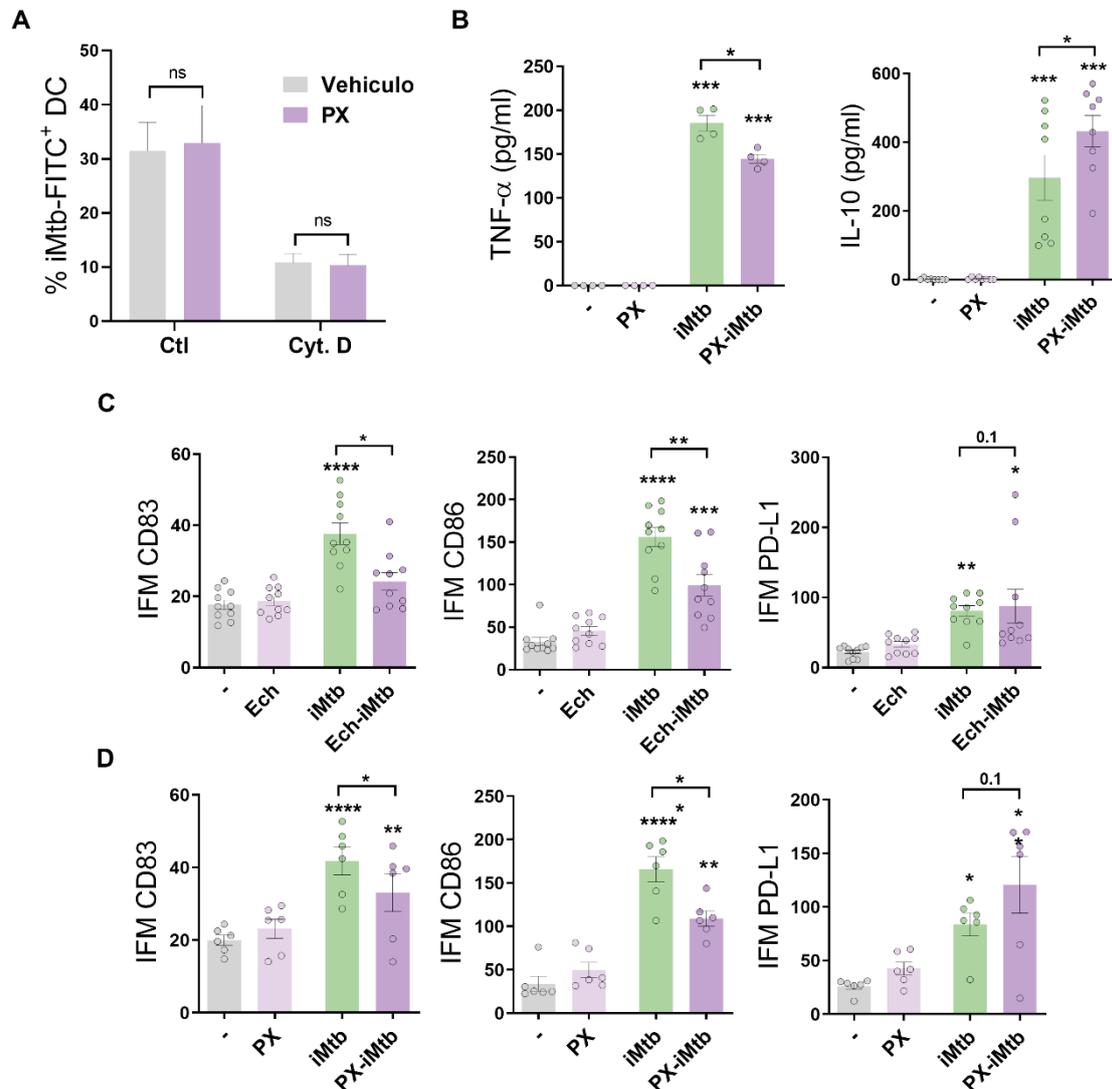
**Figura 12. La actividad de HIF1A es necesaria para activar la vía glicolítica en células dendríticas (DCs) estimuladas con *Mycobacterium tuberculosis* irradiado (iMtb).**

Las DCs derivadas de monocitos (Mo-DCs) fueron estimuladas con iMtb en presencia de PX-478 (PX, **A-C, G**) o equinomicina (Ech, **D-F, H**), ambos inhibidores de HIF1A. (**A, D**) Liberación de lactato medida en el sobrenadante (N = 6-8). (**B, E**) Consumo de glucosa medida en el sobrenadante (N = 6-8). (**C, F**) Porcentaje de células viables en relación con las DCs no tratadas (N = 4). (**G**) Perfil cinético de las mediciones de la tasa de eflujo de protones (PER) y la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (paneles de la izquierda) y su cuantificación de la producción mitocondrial de ATP y la producción glicolítica de ATP (panel derecho) (N = 4) en DCs estimuladas con iMtb y DCs estimuladas con PX-iMtb. (**H**) Contribuciones relativas de las capacidades glicolíticas y de oxidación de ácidos grasos y aminoácidos (FAO y AAO) y dependencias de glucosa y mitocondrial al metabolismo general de las DCs analizado con SCENITH en DCs expuestas a iMtb en presencia o no de Ech (N = 4). (**A-G**) ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\* $p < 0,05$ ), como se muestra en las

## Resultados

líneas. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. **(H)** Prueba T pareada (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ), representada por líneas. Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa DCs de un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

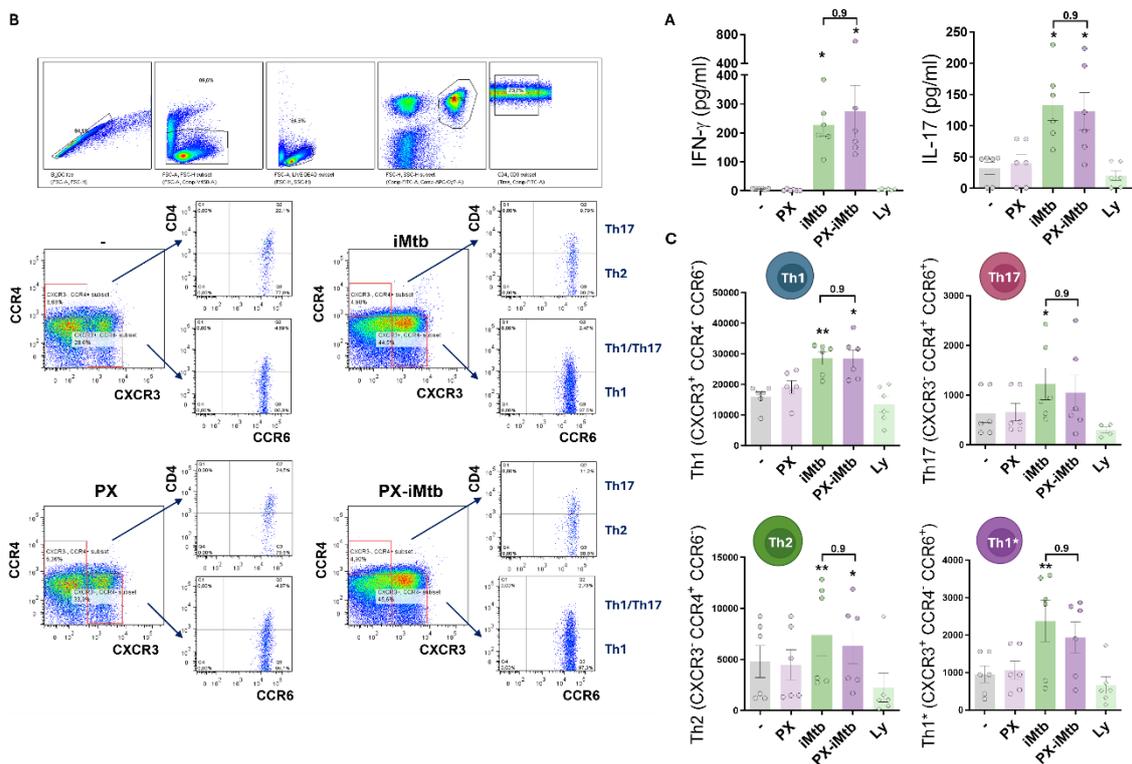
Aunque los inhibidores de HIF1A no afectaron a la captación de iMtb por las DCs (**Figura 13A**), observamos una reducción de la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  de forma concomitante a un aumento de la producción de citoquina antiinflamatoria IL-10 por parte de las células tratadas con PX (**Figura 13B**). A continuación, medimos la expresión de marcadores de superficie en DCs estimuladas con iMtb tras la inhibición de HIF1A y encontramos una disminución de la expresión de los marcadores de activación CD83 y CD86, pero no de la molécula inhibidora PD-L1, tras el tratamiento con Ech (**Figura 13C**) o PX (**Figura 13D**).



**Figura 13.** HIF1A es necesario para adquirir un fenotipo maduro en Mo-DCs.

Las DC derivadas de monocitos (Mo-DCs) fueron estimuladas con iMtb en presencia o ausencia del inhibidor de HIF1A PX-478 (PX) **(A-B, D)** o equinomicina (Ech) **(C)**. **(A)** Captación de Mtb-FITC por DCs tratadas o no con PX-478 en presencia o no de citocalasina D (Cyt D), un potente inhibidor de la fagocitosis que interfiere con la polimerización de actina (N = 4). **(B)** Producción de TNF- $\alpha$  e IL-10 por las Mo-DCs medida mediante ELISA (N = 4-8). **(C-D)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD83, CD86 y PD-L1 medida por citometría de flujo en DCs tratadas con Ech (N = 10) **(C)** o PX-478 (N = 6) **(D)**. ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001), en comparación con las células de control o según lo representado por las líneas. Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa DCs de un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

Para evaluar la capacidad de las DCs para activar células T en respuesta a antígenos micobacterianos, co-cultivamos DCs y células T CD4<sup>+</sup> autólogas de donantes sanos PPD<sup>+</sup> (indicio de la portación de linfocitos específicos contra antígenos micobacterianos) en presencia o ausencia de inhibidores de HIF1A y medimos la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17 en los sobrenadantes de cultivo, así como la expresión de marcadores de células T en la superficie celular asociados a poblaciones T CD4<sup>+</sup>, a saber: Th1, Th2, Th17 y Th1\*. No encontramos diferencias significativas en cuanto a la producción de citoquinas, así como tampoco en el perfil de activación de células T CD4<sup>+</sup> autólogas en cocultivo con DCs estimuladas con iMtb tratadas o no con PX (**Figura 14A-C**). Concluimos que, **aunque HIF1A es importante para la maduración de las DCs estimuladas con iMtb, no influye en su capacidad de activar células T CD4<sup>+</sup>, al menos *in vitro*.**



**Figura 14. La actividad de HIF1A en células dendríticas no afecta la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

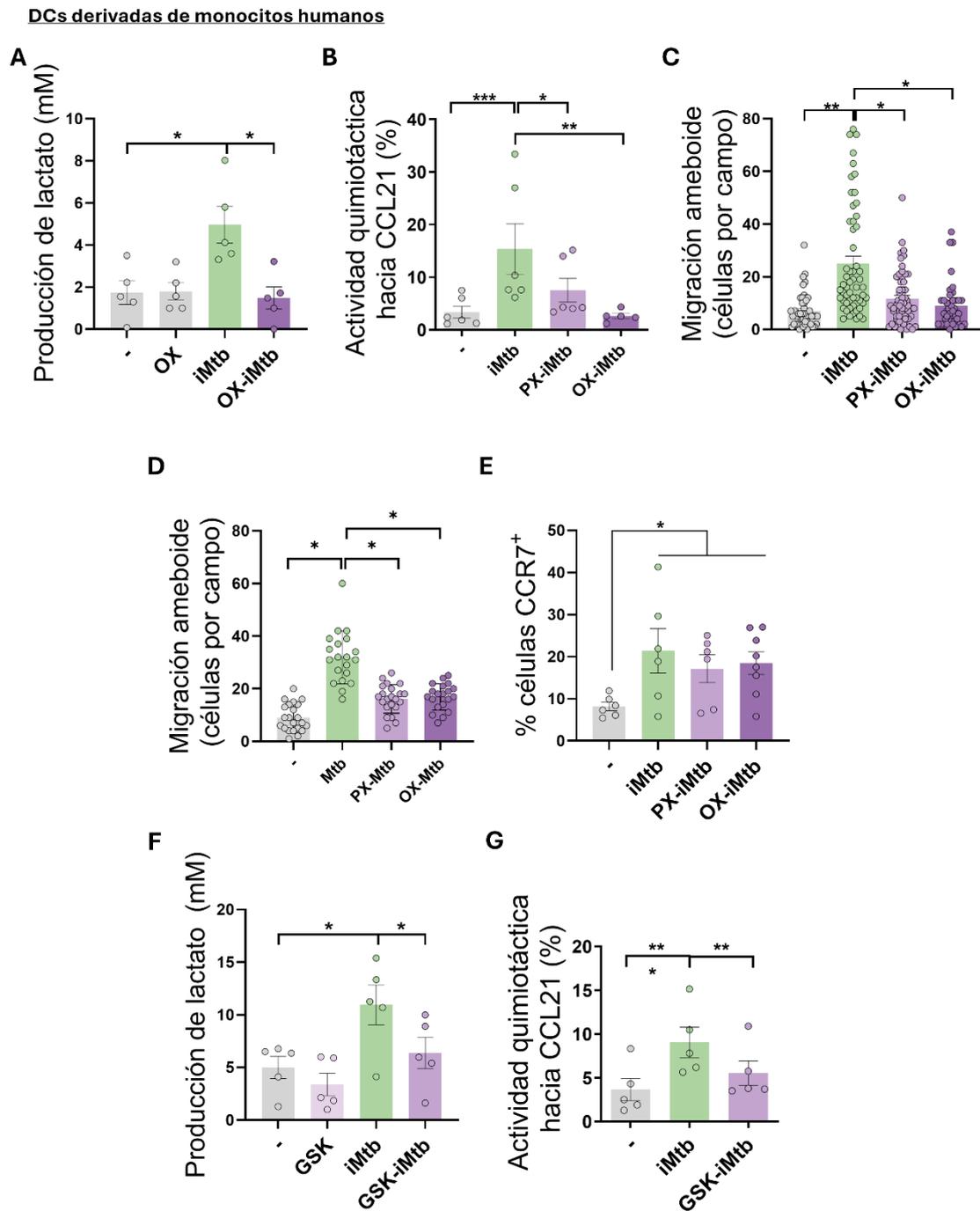
Monocitos de donantes sanos PPD<sup>+</sup> fueron diferenciados hacia DCs, desafiados o no con iMtb en presencia o ausencia de PX durante 24 hrs., lavados y co-cultivados con células T CD4<sup>+</sup> autólogas durante 5 días. **(A)** Secreción extracelular de IFN- $\gamma$  e IL-17 medida por ELISA (N = 6). **(B)** Estrategia para definir las poblaciones Th1 (células CXCR3<sup>+</sup>CCR4<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>), Th17 (células CXCR3<sup>-</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>), Th2 (células CXCR3<sup>-</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>) y Th1/Th17 (células CXCR3<sup>+</sup>CCR4<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>) o Th1\* de células T CD4<sup>+</sup> mediante FACS. **(C)** Abundancia absoluta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1, Th17, Th2 y Th1/Th17 tras el cocultivo con DCs (N = 6). Cuando se indicó, se cultivaron linfocitos sin DCs (Ly). Significación estadística basada en ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey (\*p<0,05; \*\*p<0,01). Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa DCs de un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

### La glicólisis mediada por HIF1A promueve la motilidad de las DCs tras la estimulación con iMtb

Dado que la migración de DCs a los ganglios linfáticos es esencial para iniciar una respuesta inmune adaptativa y que se ha reportado que la actividad glicolítica controla la migración de DCs tras la estimulación con LPS (Guak et al., 2018; Y. Liu et al., 2019), evaluamos las propiedades migratorias de DCs estimuladas con iMtb en presencia de inhibidores de HIF1A y LDH, que cataliza la interconversión de piruvato y lactato. En primer lugar, confirmamos que el tratamiento con PX u OX, un inhibidor de la LDH, disminuyó la actividad

glicolítica de las Mo-DCs humanas estimuladas por iMtb, como se observa en la reducción de la liberación de lactato (**Figura 15A, Figura 12A**). A continuación, utilizando un ensayo de migración transwell, observamos que el tratamiento con PX y OX disminuyó significativamente la actividad quimiotáctica de las Mo-DCs humanas estimuladas con iMtb en respuesta a CCL21 (**Figura 15B**), un ligando del receptor CCR7 responsable de la migración de las DCs a los órganos linfoides. También evaluamos la capacidad de migración tridimensional (3D) de las DCs estimuladas por iMtb a través de una matriz de colágeno en la que las DCs utilizan un modo de migración ameboide (Cougoule et al., 2018) y observamos que la migración 3D se vio significativamente afectada tras la inhibición de HIF1A o de la glicólisis tanto en DCs estimuladas por iMtb como también en DCs infectadas con Mtb viable (**Figura 15C-D**). Cabe destacar que verificamos que la expresión de CCR7 en las DCs estimuladas por iMtb no se alteró por el tratamiento con OX o PX, por lo que el efecto en la migración no se podría atribuir a la regulación negativa del receptor de quemoquinas (**Figura 15E**).

Reconfirmamos la participación de la glicólisis en la migración de las Mo-DCs estimuladas por iMtb utilizando un inhibidor alternativo de la enzima LDHA como lo es el GSK2837808A, el cual fue capaz de reducir tanto la liberación de lactato por las Mo-DCs estimuladas por iMtb como su migración en respuesta a CCL21 (**Figura 15F y G**).



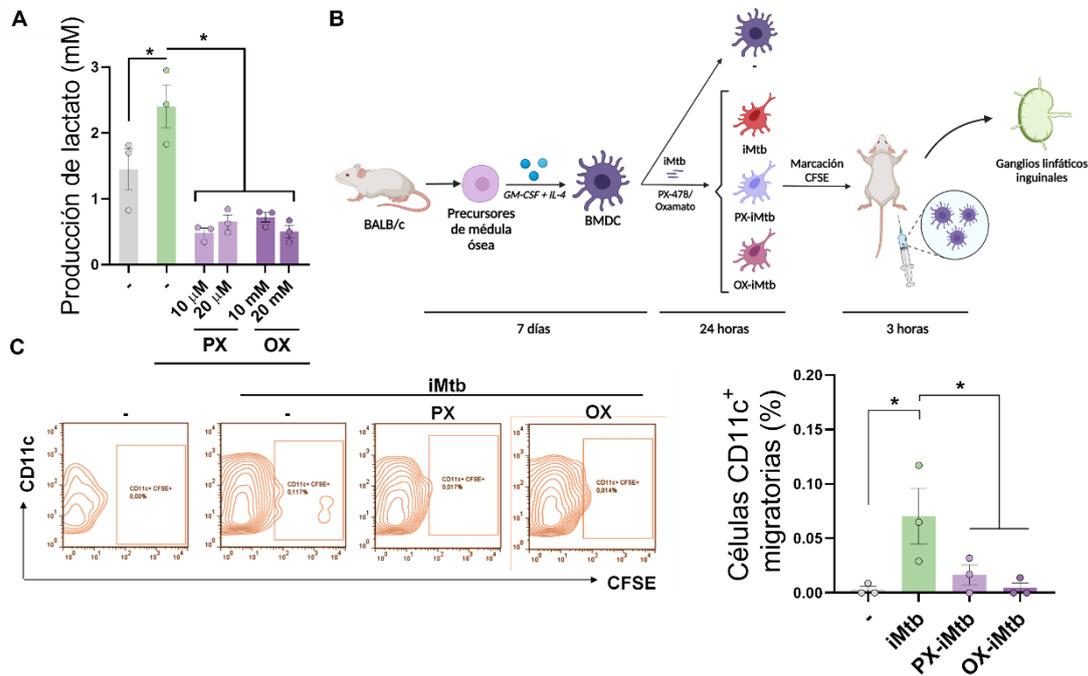
**Figura 15. La glicólisis es necesaria para desencadenar la actividad migratoria en células dendríticas (DCs) estimuladas por *Mycobacterium tuberculosis*.**

Las DCs derivadas de monocitos (Mo-DCs) se trataron (o no) con el inhibidor de HIF1A PX-478 (PX), o con los inhibidores de LDH oxamato (OX) o GSK283780A (GSK) y se estimularon con iMtb durante 24 hrs. **(A)** Liberación de lactato medida en sobrenadantes en DCs estimuladas o no con iMtb en presencia de OX (N = 5). **(B)** Porcentaje de células que migraron hacia CCL21 en relación con el número de células iniciales por condición (N = 6). **(C, D)** Migración ameboide tridimensional de DCs a través de una matriz de colágeno después de 24 hrs. Las células dentro de la matriz se fijaron y tiñeron con DAPI. Se tomaron imágenes de la membrana de cada inserto y se contó el porcentaje de células por campo. **(C)** Mo-DCs estimuladas con iMtb

durante 24 hrs. (N = 5). **(D)** Mo-DCs infectadas con Mtb durante 24 hrs. (N = 4). Los datos se representan como diagramas de dispersión, donde cada círculo representa una fotografía procedente de cinco **(C)** o cuatro **(D)** donantes independientes, y cada experimento suele incluir entre 5 y 10 fotografías. **(E)** Se estimularon las Mo-DCs con iMtb en presencia de PX-478 u OX y se midió la expresión de CCR7 mediante FACS (N = 6) **(F-G)** DCs tratadas o no con GSK y estimuladas con iMtb. **(F)** Producción de lactato medida en sobrenadante de cultivo (N = 5). **(G)** Porcentaje de células que migraron hacia CCL21 en relación con el número de células iniciales por condición (N = 5). Significación estadística evaluada mediante **(A, B)** ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (\*p<0,05; \*\*p<0,01); **(C, D)** ANOVA anidado seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (\*p<0,05; \*\*p<0,01); **(E-G)** ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001), como se muestra en las líneas.

Para investigar más a fondo los efectos de la glicólisis en la migración celular, recurrimos a un modelo *in vivo*. Se generaron DCs derivadas de médula ósea murina (BMDC) y se estimularon con iMtb en presencia o ausencia de PX u OX. De forma similar a las Mo-DCs humanas, la estimulación con iMtb aumentó la glicólisis en las BMDC, que fue inhibida por el tratamiento con PX y OX *in vitro* (**Figura 16A**). Posteriormente las BMDC se marcaron con la sonda vital CFSE, fueron tratadas con PX u OX y estimuladas con iMtb y se inocularon en ratones vírgenes (**Figura 16B**). Tres horas después de la transferencia de BMDC a los ratones receptores, se recolectaron los ganglios linfáticos cercanos al sitio de inoculación para cuantificar las DCs migratorias (**Figura 16C**). Se detectó un mayor número de DCs transferidas adoptivamente (células CD11c<sup>+</sup> marcadas con CFSE) en los ganglios linfáticos de los ratones que recibieron BMDC estimuladas con iMtb en comparación con los ratones que recibieron BMDC no tratadas o BMDC tratadas con iMtb tratadas con PX u OX (**Figura 16C**). Por tanto, concluimos que **la glicólisis mediada por HIF1A es necesaria para el éxito de la migración de las DCs estimuladas con iMtb a los ganglios linfáticos.**

**DCs derivadas de médula ósea**



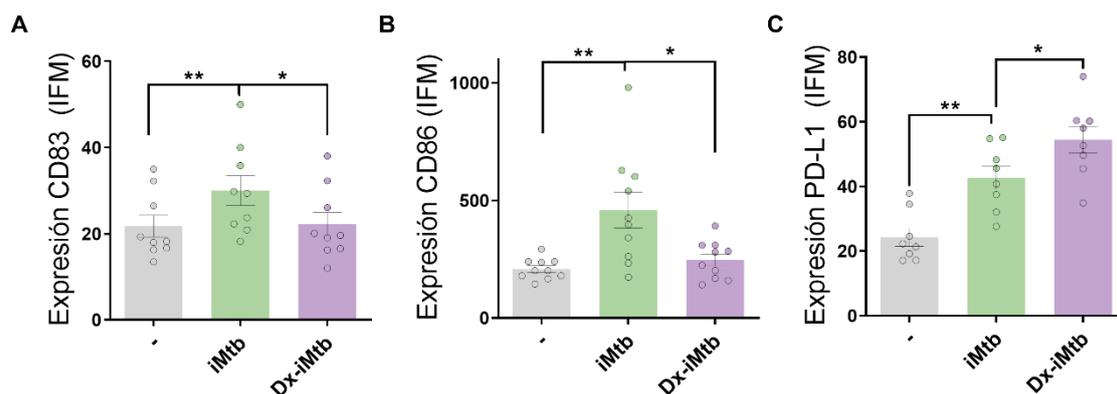
**Figura 16. La glicólisis es necesaria para desencadenar la actividad migratoria en células dendríticas (DCs) estimuladas por *Mycobacterium tuberculosis*.**

Las DCs derivadas de médula ósea (BMDC) murinas se trataron o no con PX-478 (PX) u oxamato (OX) y se estimularon con iMtb durante 24 hrs. **(A)** Esquema representativo del diseño experimental para los ensayos de migración *in vivo*. **(B)** Producción de lactato medida en sobrenadantes de cultivo **(C)** Porcentajes de BMDC CD11c<sup>+</sup> marcadas con CFSE recuperadas de ganglios linfáticos inguinales (N = 3). ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001), como se muestra en las líneas. Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa DCs de un único individuo; se muestran las medias ± SEM.

**La estabilización de HIF1A promueve la migración de DCs tolerogénicas y DCs derivadas de monocitos de pacientes con TB**

Dado que la diferenciación de DCs está sesgada, al menos parcialmente, hacia un fenotipo tolerogénico durante la TB (Balboa et al., 2013a; Parlato et al., 2018; Sakhno et al., 2015), investigamos si las DCs tolerogénicas pueden reprogramarse en DCs inmunogénicas modulando su vía glicolítica después de la estimulación con iMtb. Para ello, generamos Mo-DCs tolerogénicas añadiendo Dx antes de la estimulación con iMtb en presencia o ausencia de DMOG, droga que estabiliza la expresión de HIF1A. Dicha expresión está estrechamente regulada por proteínas que contienen el dominio proil hidroxilasa, que facilita el reclutamiento de la proteína von Hippel-Lindau (VHL), lo que conduce a la ubiquitinación y degradación de

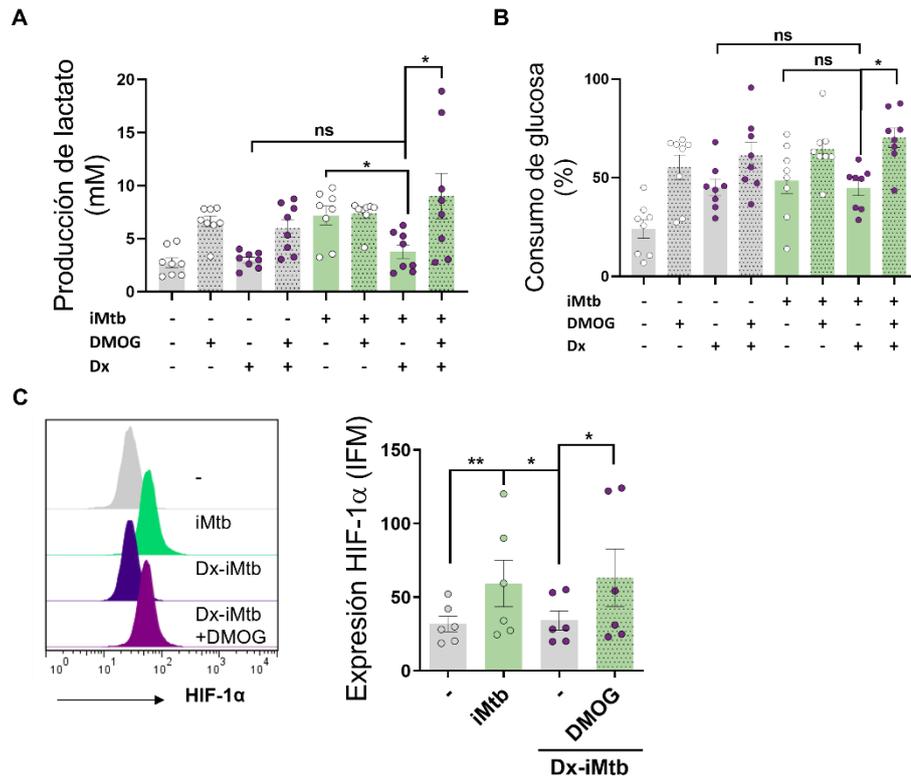
HIF1A por los proteasomas (McGettrick & O'Neill, 2020). DMOG inhibe las proteínas que contienen el dominio prolil hidroxilasa. La adquisición del fenotipo tolerogénico se confirmó por la ausencia de regulación al alza de los marcadores coestimuladores CD83 y CD86, así como por el aumento de la expresión de PD-L1 en las DCs de iMtb tratadas con Dx en comparación con las DCs de iMtb de control (**Figura 17A-C**).



**Figura 17. Perfil de las células dendríticas (DCs) tolerogénicas inducidas por dexametasona (Dx).**

Se generaron DCs tolerogénicas derivadas de monocitos (Mo-DCs) en presencia o no de Dx y se estimularon con iMtb. Intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD83 (A), CD86 y PD-L1 (N = 9). **(A-C)** ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa DCs de un único individuo. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM

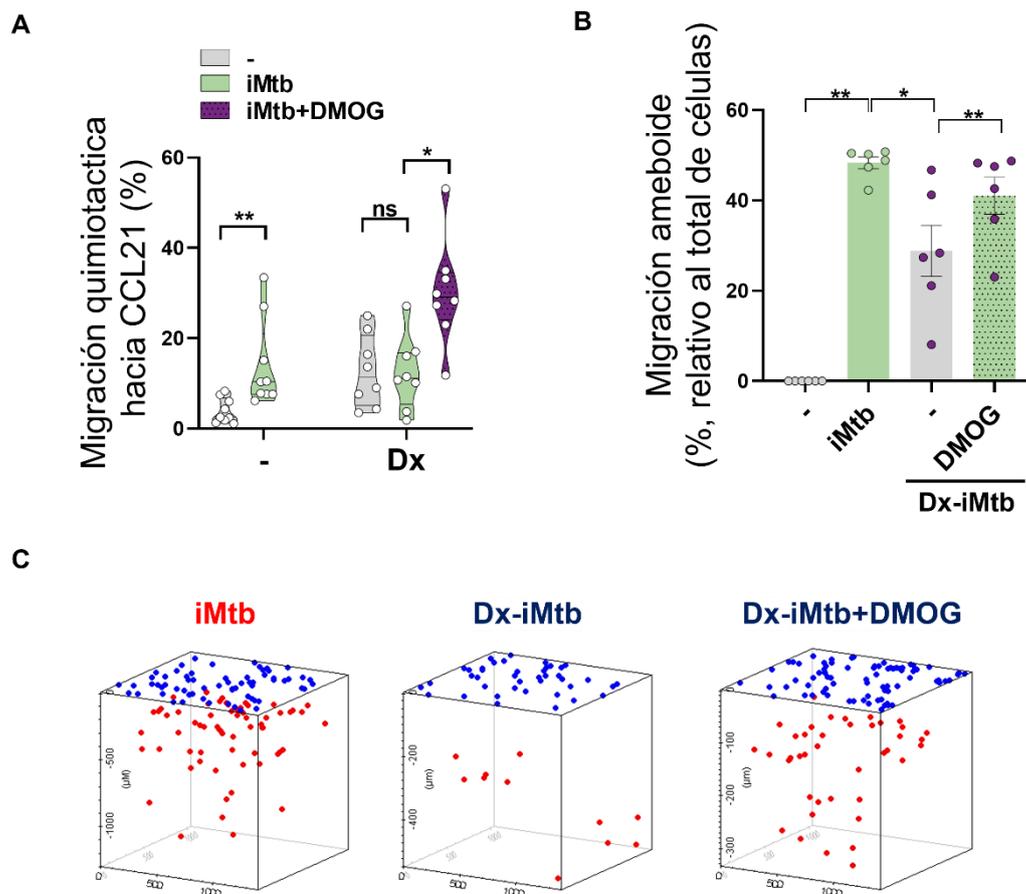
Respecto de la caracterización de parámetros glicolíticos, observamos que las DCs tratadas con Dx no mostraron un aumento en la liberación de lactato, ni en el consumo de glucosa o la inducción de la expresión de HIF1A en respuesta a iMtb, mostrando un alto consumo de los niveles de glucosa en condiciones basales (**Figura 18A-C**). Cabe destacar que la estabilización de HIF1A mediante DMOG restauró la expresión de HIF1A (**Figura 18C**) y la producción de lactato en respuesta a iMtb en DCs tratadas con Dx y aumentó el consumo de glucosa (**Figura 18A y B**).



**Figura 18. La estabilización de HIF1A restaura el metabolismo glicolítico en células dendríticas tolerogénicas (Dx-DCs).**

Las Mo-DCs tolerogénicas se generaron mediante tratamiento con dexametasona (Dx) y se estimularon (o no) con *Mycobacterium tuberculosis* irradiada (iMtb) en presencia o ausencia del activador de HIF1A dimetiloxalilglicina (DMOG). **(A)** Liberación de lactato y **(B)** consumo de glucosa medidas en el sobrenadante (N = 8). **(C)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) de HIF1A. Se muestran histogramas representativos y cuantificación (N = 6). **(A-C)** ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\*p<0,05; \*\*p<0,01). Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa DCs de un único individuo. Los valores se expresan como media ± SEM.

En forma adicional, la activación de HIF1A también mejoró la migración amebode 3D, así como la capacidad de migración 2D de las DCs hacia CCL21 de las DCs tratadas con Dx y estimuladas con iMtb (**Figura 19A-C**).

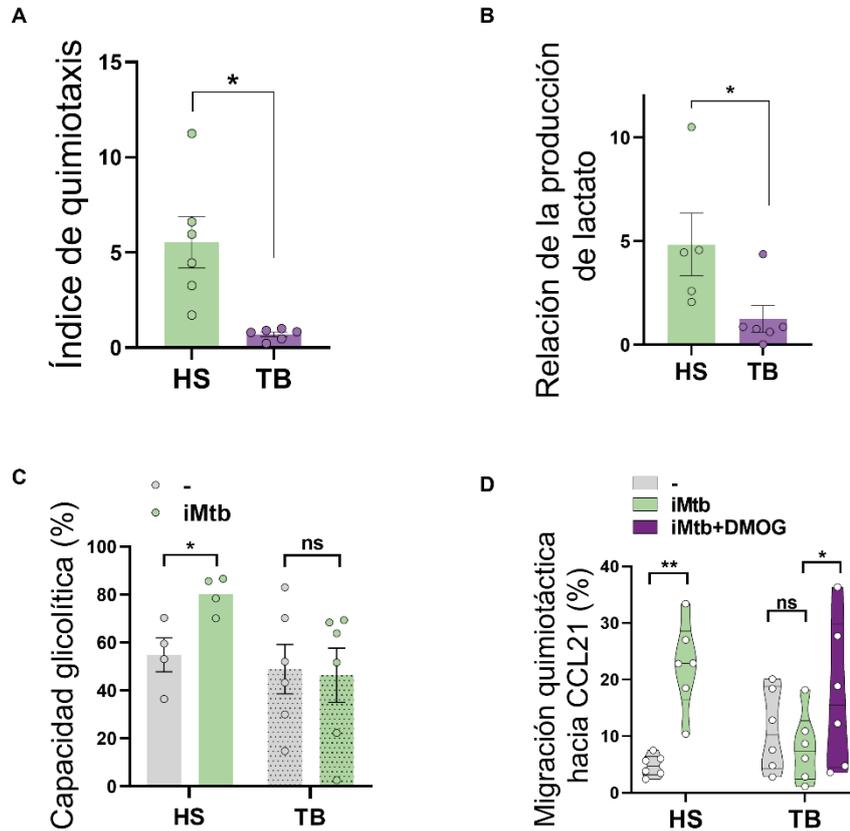


**Figura 19. La estabilización de HIF1A promueve la migración en células dendríticas tolerogénicas (Dx-DCs).**

Las Mo-DCs tolerogénicas se generaron mediante tratamiento con dexametasona (Dx) y se estimularon (o no) con *Mycobacterium tuberculosis* irradiada (iMtb) en presencia o ausencia del activador de HIF1A dimetiloxalilglicina (DMOG). **(A)** Actividad quimiotáctica hacia CCL21 *in vitro* (N = 6). **(B)** Migración ameboide tridimensional de DCs a través de una matriz de colágeno. Tras 24 hrs. de migración, se tomaron imágenes en el plano z dentro de la matriz cada 30  $\mu\text{m}$ . El porcentaje de células migratorias se definió como las células en los *stack* dentro de la matriz en relación con el número total de células (N = 6). **(C)** Esquemas representativos de células en migración a través de una matriz de colágeno. ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ), como se representa mediante líneas.

A continuación, decidimos validar nuestros hallazgos en Mo-DCs de pacientes con TB. Encontramos que las Mo-DCs estimuladas con iMtb procedentes de pacientes con TB eran deficientes en su capacidad de migración hacia CCL21 (**Figura 20A**) e incrementar su actividad glicolítica en comparación con las Mo-DCs procedentes de sujetos sanos (**Figura 20B y C**). De forma destacada, la estabilización de la expresión de HIF1A lograda mediante la adición de DMOG en las Mo-DCs de pacientes con TB restauró su actividad quimiotáctica en respuesta a iMtb (**Figura 20D**). Estos datos indican que **el deterioro de la capacidad migratoria de las DCs tolerogénicas**

**estimuladas por iMtb o de las DCs derivadas de pacientes con TB puede restablecerse mediante la estabilización de HIF1A-**. En líneas generales, los resultados hasta el momento nos permiten concluir que el incremento de la glicólisis es fundamental para la función migratoria de las DCs en respuesta a Mtb en el modelo murino y en células humanas.



**Figura 20. La estabilización de HIF1A promueve la migración en células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DCs) de pacientes con tuberculosis (TB).**

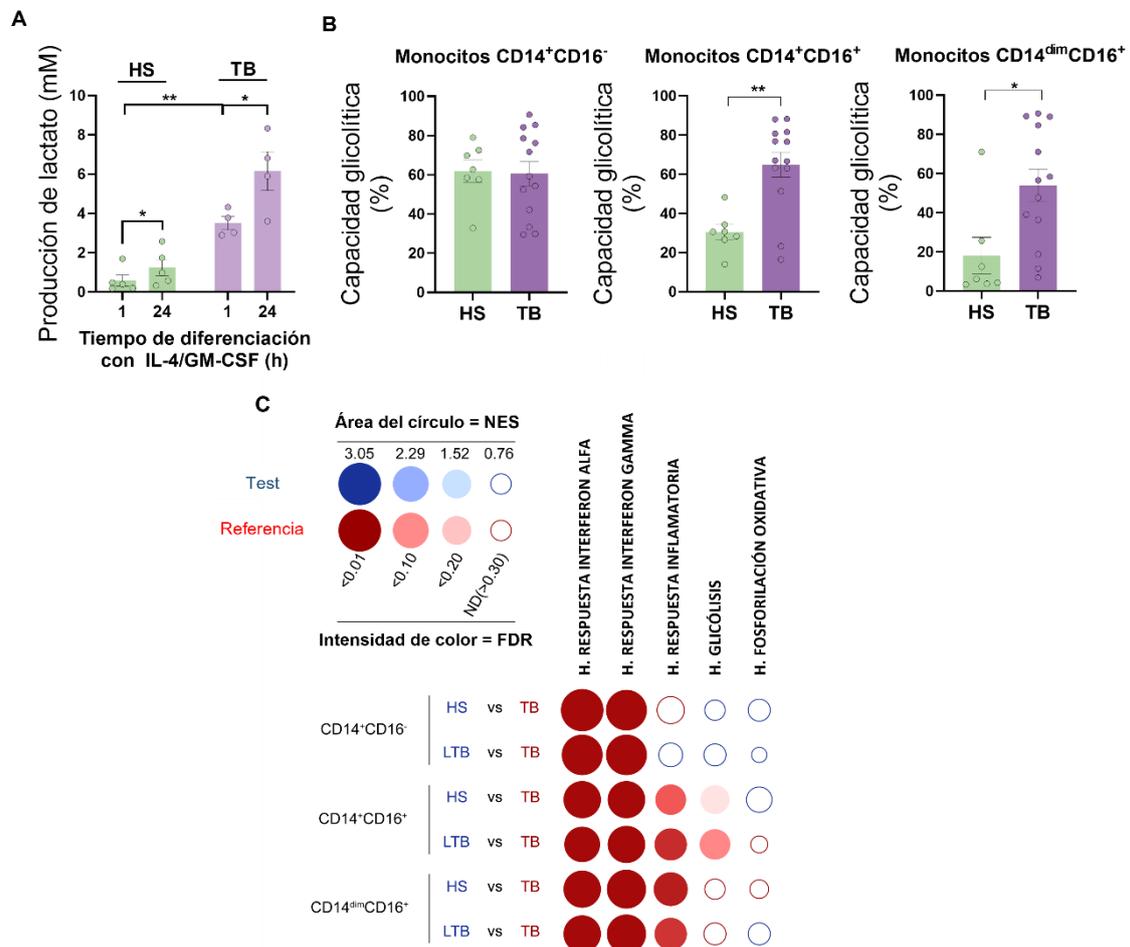
**(A-D)** Se generaron Mo-DC a partir de sujetos sanos (HS) o pacientes con TB, y las DCs se estimularon (o no) con iMtb. **(A)** Índice de quimiotaxis hacia CCL21 (en relación con las DCs no estimuladas) (N = 6). **(B)** Índice de producción de lactato en relación con las DCs no estimuladas (N = 6). **(C)** Capacidad glicolítica evaluada mediante SCENITH (N = 4). **(D)** Actividad quimiotáctica hacia CCL21 de Mo-DCs de pacientes con TB estimuladas con iMtb y tratadas o no con DMOG (N = 6). Significación estadística evaluada mediante **(A-C)** prueba t no emparejada (\*p<0,05); **(D)** prueba t emparejada (\*p<0,05). Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa DCs de un único individuo; se muestran las medias ± SEM.

### Los monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB muestran una mayor capacidad glicolítica

Dado que observamos diferencias en la actividad metabólica de las DCs derivadas de monocitos de pacientes con TB en comparación con las de

donantes sanos, a continuación, nos centramos en evaluar la liberación de lactato por los precursores de DCs de ambos grupos de sujetos durante las primeras horas de diferenciación con IL-4/GM-CSF. Encontramos una elevada liberación de lactato por parte de los monocitos de los pacientes con TB en comparación con los donantes sanos tras 1 hora de diferenciación (**Figura 21A**). La acumulación de lactato aumentó en ambos grupos de sujetos tras 24 horas con IL-4/GM-CSF (**Figura 21A**). Basándonos en estas actividades glicolíticas diferenciales mostradas por los precursores de DCs de ambos grupos de sujetos en fases muy tempranas del proceso de diferenciación, decidimos evaluar el perfil metabólico *ex vivo* de los monocitos utilizando SCENITH. Para ello, evaluamos la capacidad glicolítica basal de las tres poblaciones principales de monocitos: monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) y no clásicos (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>). Encontramos que ambas poblaciones de monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB tenían una mayor capacidad glicolítica que los monocitos de donantes sanos (**Figura 21B**).

Para ampliar la caracterización metabólica de las poblaciones de monocitos de pacientes con TB, utilizamos datos transcriptómicos previamente publicados (número de acceso GEO: GSE185372) de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> aislados de individuos con TB activa, TB latente (IGRA<sup>+</sup>), así como de controles sanos TB-negativos (IGRA<sup>-</sup>) (Hillman et al., 2023). Dentro de este marco, realizamos un GSEA utilizando el módulo *BubbleMap* de *BubbleGUM*, que incluye un paso de corrección de pruebas múltiples para permitir comparaciones entre las tres poblaciones de monocitos (Spinelli et al., 2015). Como era de esperar, este enfoque reveló enriquecimientos en genes asociados con respuestas al interferón (alfa y gamma) en pacientes con TB activa en comparación con donantes sanos (ya sea IGRA<sup>-</sup> o TB latente) para los tres subconjuntos de monocitos (Figura XD). En consonancia con nuestros hallazgos, la glicólisis aumenta en la TB activa tanto en los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> como en los CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (aunque no de forma significativa), mientras que parece disminuir en los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> clásicos (**Figura 21D**). A diferencia de las células CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, la respuesta inflamatoria está notablemente enriquecida en los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB activa en comparación con aquellos con TB latente o sujetos sanos (**Figura 21D**), lo que sugiere que su perfil glicolítico se correlaciona con un mayor estado inflamatorio. Por último, no se encontró un enriquecimiento significativo de genes asociados a la fosforilación oxidativa en ninguna de las comparaciones realizadas (**Figura 21D**). En conjunto, estos resultados demuestran que **la enfermedad tuberculosa se asocia a un aumento de la activación y del perfil glicolítico de los monocitos CD16<sup>+</sup> circulantes**.



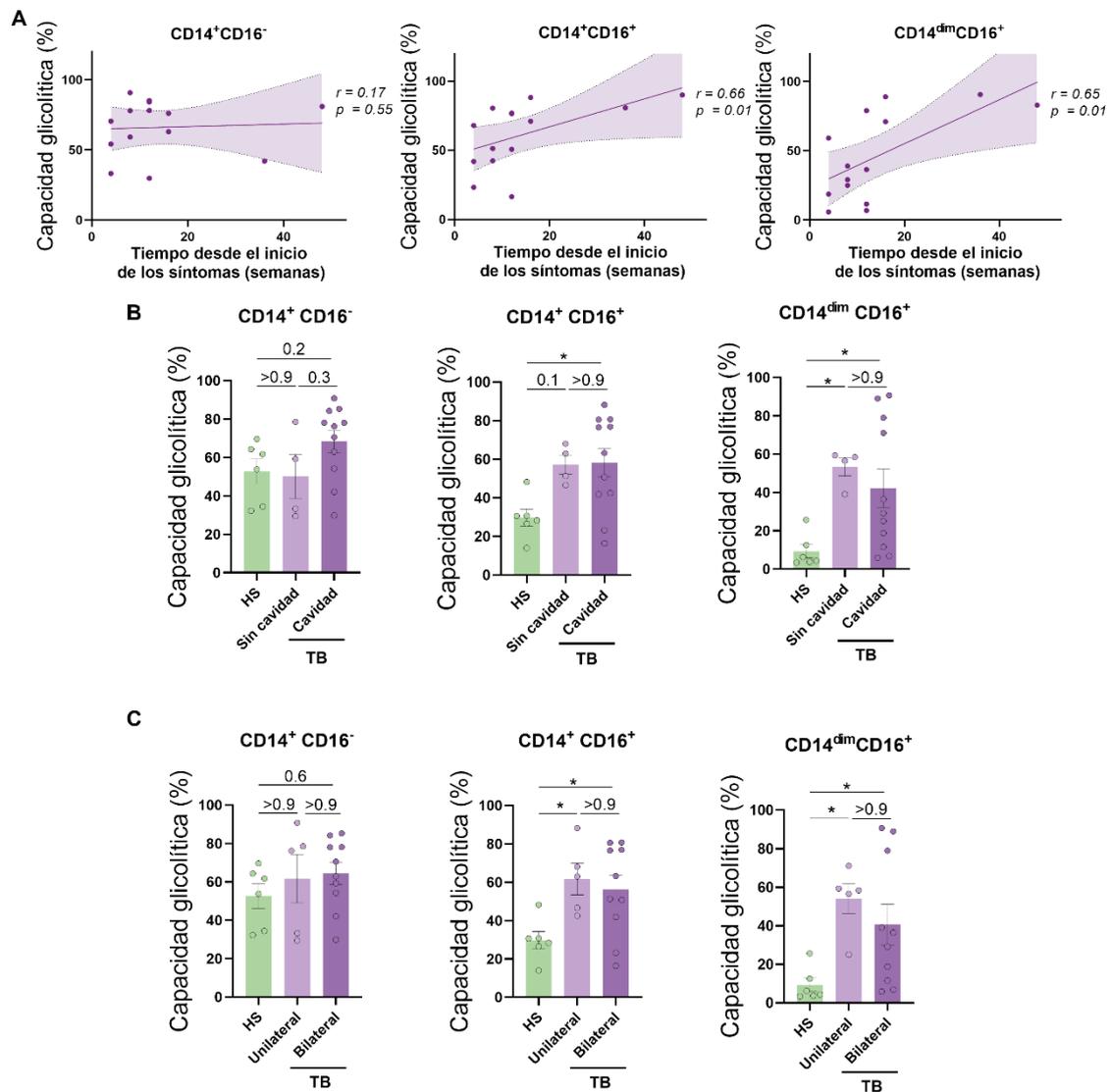
**Figura 21. Los monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con tuberculosis (TB) muestran una mayor capacidad glicolítica.**

**(A)** Se aislaron monocitos de pacientes con TB o de sujetos sanos (HS) y se cultivaron con IL-4 y GM-CSF durante 24 horas. Se midió la acumulación de lactato en los sobrenadantes de cultivo tras 1 y 24 horas de diferenciación (N = 5). **(B)** Capacidad glicolítica medida mediante SCENITH de las poblaciones de monocitos definidos por su expresión de CD14 y CD16 de dadores sanos (HS) y pacientes con TB (N = 7). **(C)** Análisis BubbleMap, una extensión *high throughput* del Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Genes (GSEA), en las comparaciones por pares de monocitos de HS o donantes con TB latente (LTB) frente a pacientes con TB activa (TB), para cada población de monocitos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>). Los conjuntos de genes mostrados proceden de la colección Hallmark (H) de la *Molecular Signature Database* (MSigDB). Los colores del BubbleMap corresponden a la población en la que el conjunto de genes está enriquecido (la codificación es color rojo para el conjunto de genes enriquecido en TB). El área de la burbuja es proporcional a la magnitud del enriquecimiento normalizada GSEA (NES). La intensidad del color corresponde a la significación estadística del enriquecimiento (FDR), obtenida calculando el valor p basado en permutaciones ajustadas a pruebas múltiples utilizando la corrección de Benjamini-Yekutieli. Los enriquecimientos con una significación estadística superior a 0,30 se representan con círculos vacíos. La significación estadística se evaluó mediante **(A)** prueba T pareada para 0 frente a 24 hrs. (\*p<0,05) y ANOVA de dos vías

## Resultados

para HS frente a TB en cada tiempo (\*\* $p < 0,01$ ); **(B)** prueba T no pareada ( $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa monocitos de un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

Además, la capacidad glicolítica de los monocitos  $CD16^+$  ( $CD14^+CD16^+$  y  $CD14^{dim}CD16^+$ ) se correlaciona con el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas relacionados con la TB (**Figura 22A**), pero no se encontró una asociación al comparar la capacidad glicolítica con la extensión o gravedad de la enfermedad pulmonar (lesiones unilaterales/bilaterales y presencia/ausencia de cavidades, **Figura 22B y C**).



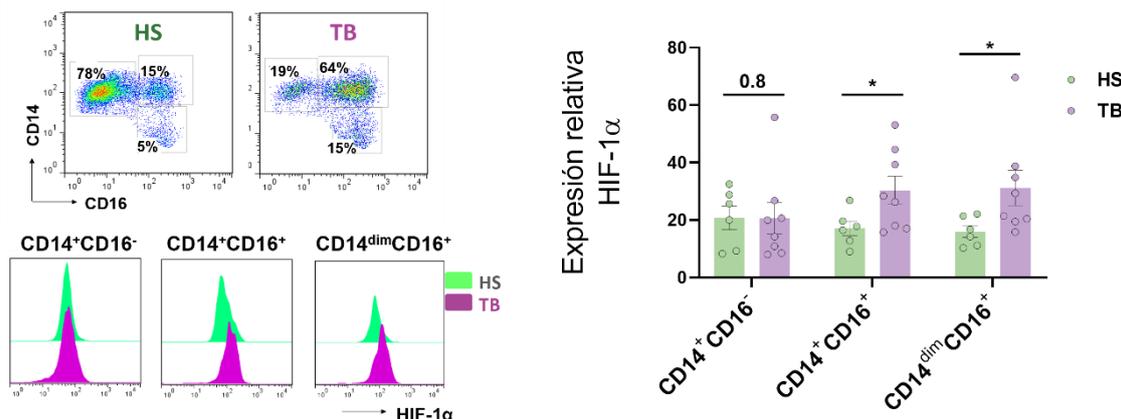
**Figura 22. Asociación entre el estado glicolítico basal de los monocitos y la gravedad de la enfermedad pulmonar.**

**(A)** Análisis de correlación entre la capacidad glicolítica basal y el tiempo de evolución de los síntomas de TB para cada población de monocitos ( $CD14^+CD16^-$ ,  $CD14^+CD16^+$  y  $CD14^{dim}CD16^+$ ,  $N = 14$ ). El término evolución de los síntomas se refiere al periodo de tiempo durante el cual un paciente experimenta tos y flemas durante más de 2-3 semanas, con o sin esputo que puede

o no ser sanguinolento, acompañado de síntomas de enfermedad constitucional (como pérdida de apetito, pérdida de peso, sudores nocturnos y malestar general). Se evaluó la capacidad glicolítica en poblaciones de monocitos de pacientes con tuberculosis (TB) con **(B)** enfermedad cavitaria frente a no cavitaria, lo que refleja la gravedad de la enfermedad o con **(C)** enfermedad bilateral frente a unilateral, lo que refleja la extensión de la enfermedad (N = 4-11). **(A)** Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa a un único individuo. Se muestran las líneas de regresión lineal. Prueba de rango de Spearman. **(B-C)** Los valores p se calcularon mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la corrección de Dunn para comparaciones múltiples. Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa monocitos de un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

### La activación de HIF1A en monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB da lugar a DCs diferenciadas con escasa capacidad de migración

Dado que los monocitos CD16<sup>+</sup> circulantes de pacientes con TB presentan una alta actividad glicolítica en condiciones basales, evaluamos la expresión de HIF1A entre las poblaciones. En forma concordante, encontramos que los monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB mostraron una mayor expresión de HIF1A que los de donantes sanos (**Figura 23**).

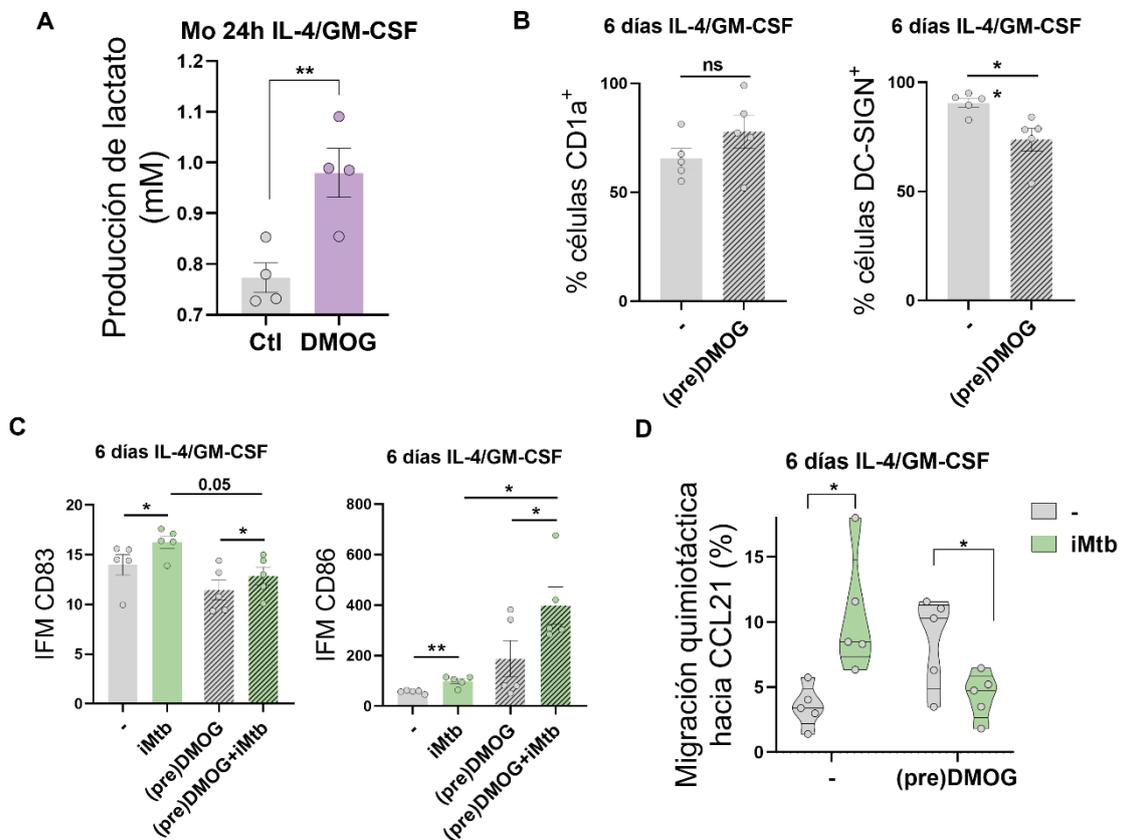


**Figura 23. Los monocitos de pacientes con tuberculosis (TB) presentan un aumento en la expresión de HIF1A.**

Determinación *ex vivo* de la expresión de HIF1A de monocitos provenientes de sujetos sanos (HS) o pacientes con TB (TB) para cada población de monocitos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) (N = 6). Significancia estadística fue evaluada por prueba T no pareada (\*p<0,05). Los datos se representan como gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa monocitos de un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

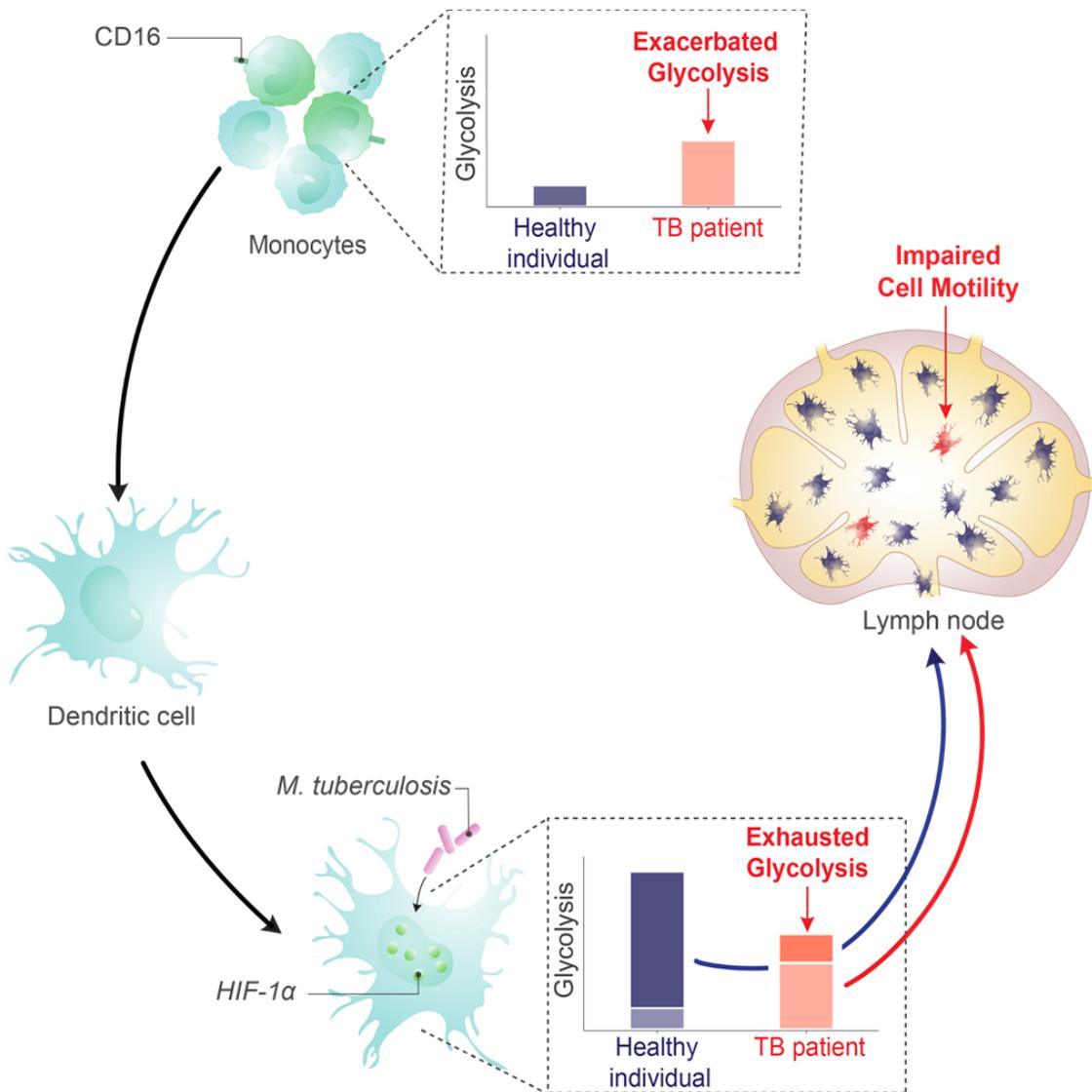
Dado que anteriormente demostramos que los monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB son propensos a generar DCs aberrantes (Balboa et al., 2013a), planteamos la hipótesis de que el diferente perfil metabólico de esta población de monocitos podría generar DCs con una capacidad glicolítica agotada y, por tanto, una menor actividad migratoria tras la exposición a Mtb.

Para probar esta hipótesis, tratamos monocitos de donantes sanos con DMOG para aumentar la actividad de HIF1A durante las primeras 24 horas de diferenciación, lo que provocó un aumento exacerbado de la liberación de lactato en las primeras fases de la diferenciación (**Figura 24A**). Esta adición temprana de DMOG a monocitos sanos dio lugar a la generación de DCs (6 días con IL-4/GM-CSF) caracterizadas por niveles equivalentes del marcador de superficie CD1a que las DCs de control, y una disminución significativa de la expresión de DC-SIGN (**Figura 24B**). En cuanto a la expresión de marcadores de activación, las DCs diferenciadas a partir de células pretratadas con DMOG respondieron al iMtb regulando al alza el CD86 a niveles más altos en comparación con las células de control, con una tendencia concomitante hacia la reducción de la regulación al alza del CD83 (**Figura 24C**). También observamos que las DCs cuyos precursores fueron pretratados con DMOG mostraron una menor capacidad migratoria en respuesta a iMtb (**Figura 24D**), similar a las capacidades de migración 2D de las Mo-DCs de pacientes con TB. En conjunto, nuestros datos sugieren que **el estado glicolítico activado de los monocitos de pacientes con TB los predispone a generar DCs con baja motilidad en respuesta a Mtb.**



**Figura 24. La activación prematura de HIF1A en monocitos da lugar a células dendríticas (DCs) con escasa capacidad de migración.**

Los monocitos de dadores sanos (HS) fueron expuestos únicamente a dimetiloxalilglicina (DMOG) durante las primeras 24 hrs. de diferenciación con IL-4/GM-CSF (preDMOG). Al día 6 de diferenciación, las células fueron estimuladas (o no) con *Mycobacterium tuberculosis* irradiado (iMtb). **(A)** Liberación de lactato por los monocitos tras 24 hrs. de adición de DMOG (N = 4). **(B)** Porcentaje de células que expresan CD1a y DC-SIGN tras 6 días completos de diferenciación (N = 5). **(C)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD83 y CD86 en células diferenciadas el día 6 estimuladas o no con iMtb durante 24 hrs. más (N = 5) **(D)** Actividad quimiotáctica hacia CCL21 de DCs (N = 5). La significación estadística se evaluó mediante **(A-B)** prueba T pareada (\*\* $p < 0,01$ ); **(C-D)** ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (\* $p < 0,05$ ). Los datos se representan en forma de gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa células de un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.



**Figura 25. Resumen gráfico del primer capítulo.**

Durante la tuberculosis, los monocitos CD16<sup>+</sup> presentan una glicólisis exacerbada que promueve la diferenciación en DCs que, frente a la infección con Mtb, son deficientes en glicólisis

la vía glicolítica y, consecuentemente, en su capacidad de migrar a ganglios linfáticos. Figura obtenida de (Maio et al., 2024)

### Conclusiones parciales de la primera parte

- Mtb afecta al metabolismo de las Mo-DCs, provocando cambios mitocondriales y desencadenando parámetros asociados a la glicólisis.
- En las Mo-DCs expuestas a Mtb se produce un cambio metabólico hacia la glicólisis aeróbica, que prima sobre la fosforilación oxidativa.
- Mtb induce la glicólisis en las Mo-DCs a través del reconocimiento mediado por TLR2.
- La reconfiguración metabólica hacia la glicólisis que sufren las Mo-DCs frente a la estimulación por iMtb depende de la actividad del factor de transcripción HIF1A.
- Aunque HIF1A es importante para la maduración de las DCs estimuladas con iMtb, no influye en su capacidad de activar células T CD4<sup>+</sup>, al menos *in vitro*.
- La glicólisis mediada por HIF1A es necesaria para la migración eficiente de las DCs estimuladas con iMtb a los ganglios linfáticos.
- El deterioro de la capacidad migratoria de las DCs tolerogénicas estimuladas por iMtb o de las DCs derivadas de pacientes con TB puede restablecerse mediante la estabilización de HIF1A.
- La TB se asocia a un aumento de la activación del perfil glicolítico de los monocitos CD16<sup>+</sup> circulantes.
- El estado glicolítico activado de los monocitos de pacientes con TB conduce a la generación de DCs con baja motilidad en respuesta a Mtb.

### Capítulo II: impacto de la modulación del eje glicólisis/HIF1A en las DCs sobre el inicio de la respuesta adaptativa contra micobacterias.

#### La cepa vacunal BCG induce la vía glicolítica en BMDC

En comparación con otras infecciones, la inducción de la respuesta inmune adaptativa contra Mtb se produce de manera retardada tanto en animales (Chackerian et al., 2002) como en humanos (Wallgren, 1984). Se ha demostrado que el inicio de esta respuesta inmune adaptativa depende del transporte de bacterias vivas desde los pulmones hasta los ganglios mediastínicos (Wolf et al., 2008a), y las DCs mieloides juegan un papel clave en este proceso (Wolf et al., 2007). Estudios recientes en primates no humanos

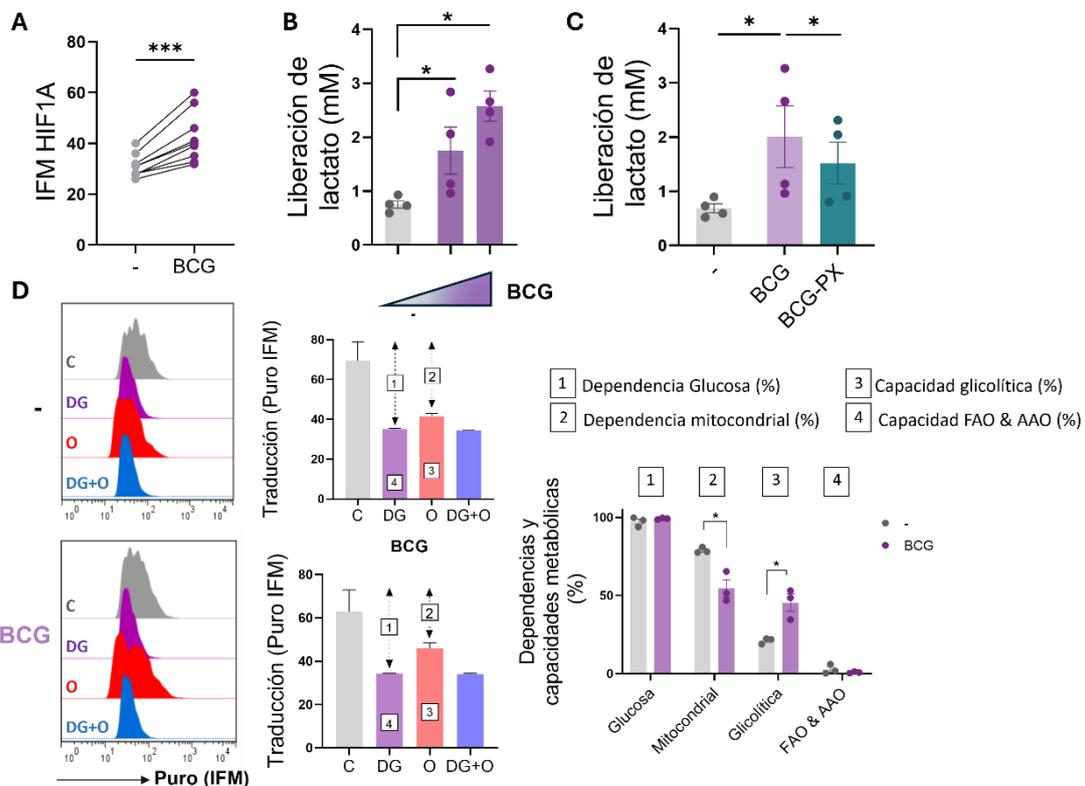
han demostrado que la calidad de la respuesta inmune adaptativa contra Mtb cambia significativamente con el tiempo. Al inicio de la infección participa una población de linfocitos T que no se vuelve plenamente activa hasta después de tres meses, mientras que después de cinco meses se observa una segunda población de linfocitos T que contribuye a la eliminación de la bacteria y a la recuperación de la infección (Grant et al., 2022), sugiriendo la existencia de mecanismos tempranos de inhibición de la respuesta inmune.

Por lo tanto, acelerar la migración de las DCs desde los pulmones hacia los ganglios linfáticos drenantes podría potenciar la llegada de Mtb a los ganglios linfáticos mediastínicos en la fase temprana, lo que posiblemente permitiría la generación de una respuesta inmunitaria eficaz antes de que los mecanismos inhibitorios desplegados por los bacilos que colonizan el pulmón puedan establecerse.

Aunque aún no se ha determinado si la rapidez en el inicio de la respuesta inmune adaptativa puede influir en el control de la infección, algunas evidencias sugieren que un inicio más temprano está asociado con un mejor control de esta. Por ejemplo, se ha observado que los ratones de la cepa C3H, que son altamente susceptibles a la infección por Mtb, presentan una lenta diseminación e inicio de la respuesta inmune adaptativa en comparación con los ratones más resistentes de la cepa C57BL/6 (Chackerian et al., 2002).

Basado en esto, la hipótesis de trabajo propuesta para esta segunda parte asume que **la migración de las DCs a ganglios linfáticos promovida por la glicólisis dependiente de HIF-1 $\alpha$  acelera la inducción de la respuesta adaptativa en respuesta a micobacterias.**

Con el fin de contrastar esta hipótesis, generamos DCs derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 vírgenes, las tratamos o no con PX-478 (PX) y las infectamos con la cepa vacunal BCG. En primera instancia nos propusimos evaluar el perfil metabólico que adoptan estas células frente a la infección con BCG. Observamos que la infección con BCG induce la expresión del factor de transcripción HIF1A (**Figura 26A**), acompañado con un aumento en la producción de lactato de forma dosis dependiente (**Figura 26B**). Además, verificamos que la inhibición de HIF1A con PX-478 es capaz de abolir el incremento en la liberación de lactato de las BMDC infectadas con BCG (**Figura 26C**). Al evaluar el metabolismo a nivel celular, encontramos que la infección con BCG induce la capacidad glicolítica en BMDC, acompañado de una reducción de la dependencia mitocondrial (**Figura 26D**). En conjunto estos resultados indican que las **BMDC adoptan un metabolismo glicolítico en respuesta a la infección con BCG.**

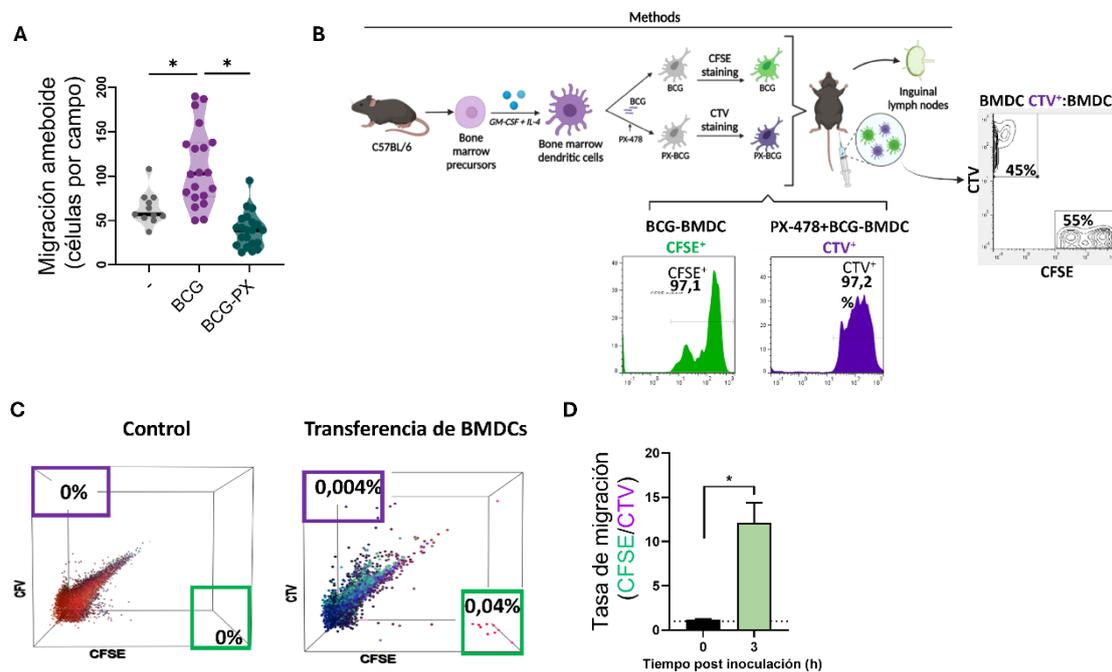


**Figura 26. La cepa vacunal BCG induce la glicólisis en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de forma HIF1A dependiente.**

Se generaron células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de ratones hembra C57BL/6 de entre 4 y 6 semanas de edad, se infectaron con BCG y se trataron o no con PX-478 (PX). **(A)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) de HIF1A en BMDC infectadas con BCG a una multiplicidad de infección 1:1 (N = 7). **(B)** Liberación de lactato al sobrenadante de BMDC infectadas con cantidades crecientes de BCG (N = 4). **(C)** Liberación de lactato medida en sobrenadantes de cultivos de BMDC infectadas con BCG y tratadas o no con PX-478 (N = 4). **(D)** En el panel de la izquierda se encuentran histogramas representativos que muestran el nivel de traducción tras la incorporación de puromicina (Puro) y la tinción con un anti-Puro monoclonal (intensidad de fluorescencia media [IFM] anti-Puro) en respuesta al tratamiento con inhibidores (C, control; DG, 2-deoxi-d-glucosa; oligomicina, O; o tratamiento combinado, DG + O). Los gráficos de barras muestran los valores de la IFM anti-Puro de seis donantes. Las flechas y los números dentro de los recuadros denotan las diferencias entre la IFM de Puro en los distintos tratamientos que se utilizan para calcular la dependencia de la glucosa (1) y la capacidad de oxidación de ácidos grasos y aminoácidos (FAO y AAO) (4); y la dependencia mitocondrial (2) y la capacidad glicolítica (3). En el panel de la derecha se indican las capacidades glicolíticas y FAO y AAO y de las dependencias glucosa y mitocondrial al metabolismo global de las BMDC analizadas con SCENITH (N = 3). La significancia estadística se evaluó mediante la prueba t pareada Tukey (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001). Los datos se representan en forma de gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa BMDC derivadas de un único ratón; se muestran las medias ± SEM.

## La glicólisis mediada por HIF1A promueve la migración de las BMDC a ganglios linfáticos

Para determinar el impacto de la inhibición de la actividad de HIF1A en la migración de BMDC, tratamos o no con PX-478 BMDC infectadas con BCG y evaluamos su capacidad de migrar *in-vitro* a través de matrices de colágeno. Observamos que aquellas BMDC infectadas con BCG tienen una mayor capacidad de migrar a través de estas matrices, pero la inhibición de HIF1A disminuye esta función celular (**Figura 27A**). Posteriormente, decidimos evaluar la capacidad migratoria de las BMDC hacia ganglios linfáticos *in vivo*. Para ello, transferimos de forma intradérmica una mezcla de BMDC infectadas con BCG en presencia o ausencia de PX-478 teñidas con CTV o CFSE respectivamente a ratones vírgenes. A las 3 horas, colectamos los ganglios linfáticos drenantes a la zona de inoculación y evaluamos los porcentajes de BMDC de cada tipo (CTV<sup>+</sup> o CFSE<sup>+</sup>) (**Figura 27B**). Encontramos que las BMDC infectadas con BCG y tratadas con PX-478 (CTV<sup>+</sup>) presentaron una eficacia disminuida en la migración a los ganglios linfáticos comparado con las BMDC infectadas, pero no expuestas a PX-478 (**Figura 27C y D**). Por lo tanto, **la inhibición de HIF1A limita la migración de las DCs a los ganglios linfáticos en ratones vacunados con BCG.**



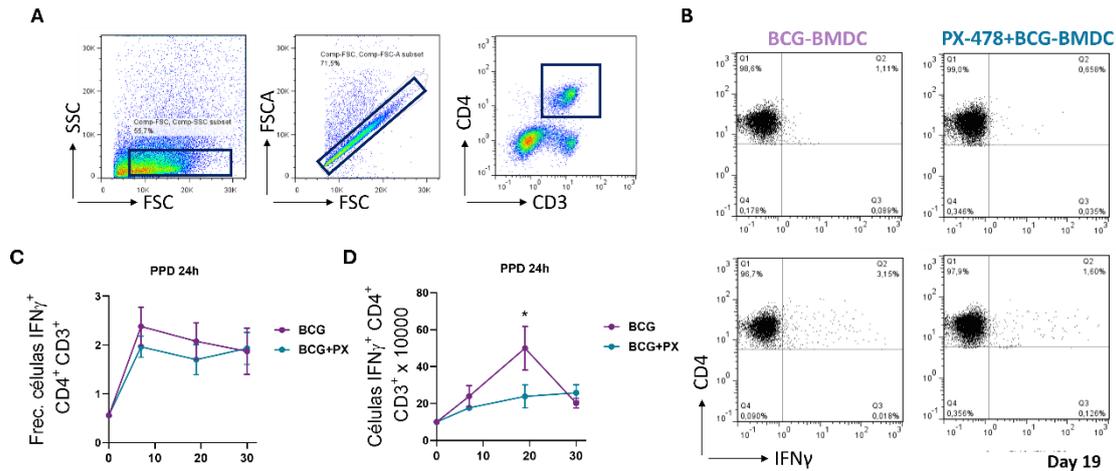
**Figura 27. La actividad de HIF1A es necesaria para la migración eficiente de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) a ganglios linfáticos.**

(A) Migración ameiboide tridimensional de BMDC a través de una matriz de colágeno después de 24 hrs. Las células dentro de la matriz se fijaron y tiñeron con DAPI. Se tomaron imágenes de la membrana de cada inserto y se contó células por campo. (B-D) Se diferenciaron BMDC a partir de ratones C57BL/6 hembra de entre 4 a 6 semanas de edad, se infectaron con BCG y se

trataron o no con PX-478 (PX). Aquellas BMDC que fueron tratadas con PX se tiñeron con el colorante Cell Trace Violet (CTV) y aquellas que solo fueron infectadas con BCG con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE). Posteriormente, se generó una mezcla de cantidades equivalentes de cada población y se inocularon intradérmicamente en la zona inguinal de ratones vírgenes y al cabo de 3 hrs. se recolectaron los ganglios linfáticos drenantes. **(B)** Esquema representativo del diseño experimental para el ensayo de migración *in vivo*. **(C)** Gráficos de puntos representativos de ganglios linfáticos obtenidos de ratones controles vs ratones inoculados con una mezcla de BMDC marcadas con CFSE o CTV. **(D)** Tasa de migración entre BMDC infectadas con BCG (CFSE<sup>+</sup>) y BMDC infectadas con BCG que fueron pretratadas con PX (CTV<sup>+</sup>). N = 3. La significancia estadística fue evaluada mediante **(D)** una prueba T pareada (\*p<0,05). **(A)** ANOVA anidado seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (\*p<0,05). Los valores se expresaron como las medias ± SEM.

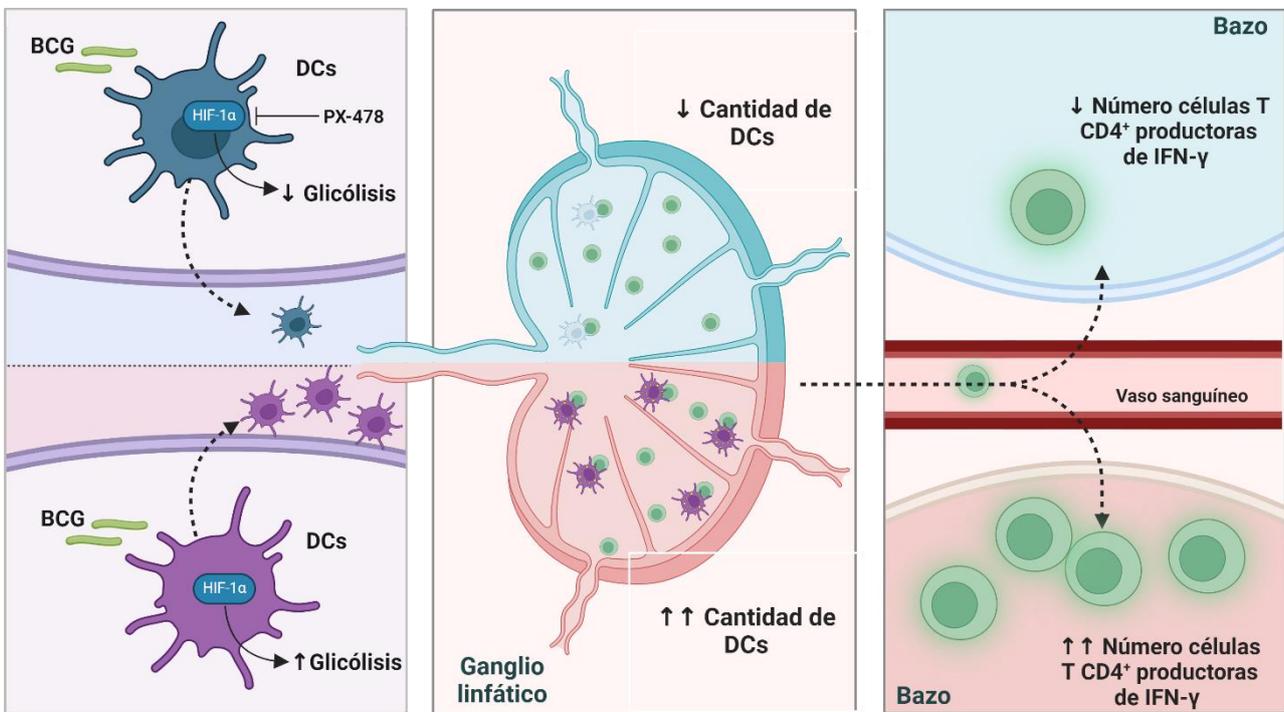
### La inhibición de la actividad de HIF1A en BMDC limita la aparición de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$

Con el fin de evaluar cómo repercute una menor actividad de HIF1A en BMDC en la inducción de la respuesta inmune adaptativa durante la inmunización con BCG, realizamos una transferencia adoptiva de BMDC infectadas con BCG tratadas o no con PX-478 a ratones C57BL/6 vírgenes. Al cabo de 7, 19 o 31 días, se recolectó el bazo de cada individuo y se estimularon los esplenocitos *in vitro* durante 24 horas con PPD de Mtb diluidas en buffer salino. Si bien no encontramos diferencias en la frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  en ninguno de los tiempos experimentales abarcados (**Figura 28A-C**), observamos que al día 19 aquellos ratones que recibieron BMDC tratadas con PX-478 tenían una menor abundancia de linfocitos productores de IFN- $\gamma$  en términos de valores absolutos respecto de ratones que recibieron BMDC sin tratar. Aunque de forma preliminar, estos datos sugieren que **una menor capacidad migratoria de las BMDC podría impactar en el inicio de la respuesta adaptativa y su cinética.**



**Figura 28. La inhibición de HIF1A en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) limita la generación de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ .**

Se realizó una transferencia adoptiva de BMDC tratadas o no con PX-478 (PX) e infectadas con BCG a ratones C57BL/6 y luego de 7,19 o 31 días se obtuvieron los esplenocitos y se estimularon *in vitro* durante 24 hrs. con PPD. **(A)** Estrategia para definir la población de linfocitos CD4<sup>+</sup> de interés. **(B)** Gráficos de puntos representativos mostrando el porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ . **(C)** Frecuencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ . **(D)** Valores absolutos de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  N=6. La significancia estadística fue evaluada mediante pruebas T pareadas (\*p<0,05). Los valores se expresaron como las medias  $\pm$  SEM.



**Figura 29. Resumen gráfico del capítulo II.**

La inhibición del eje HIF1A/glicólisis durante la infección con BCG disminuye la capacidad de estas células de migrar a ganglio linfático y retrasa la inducción de la respuesta inmune adaptativa.

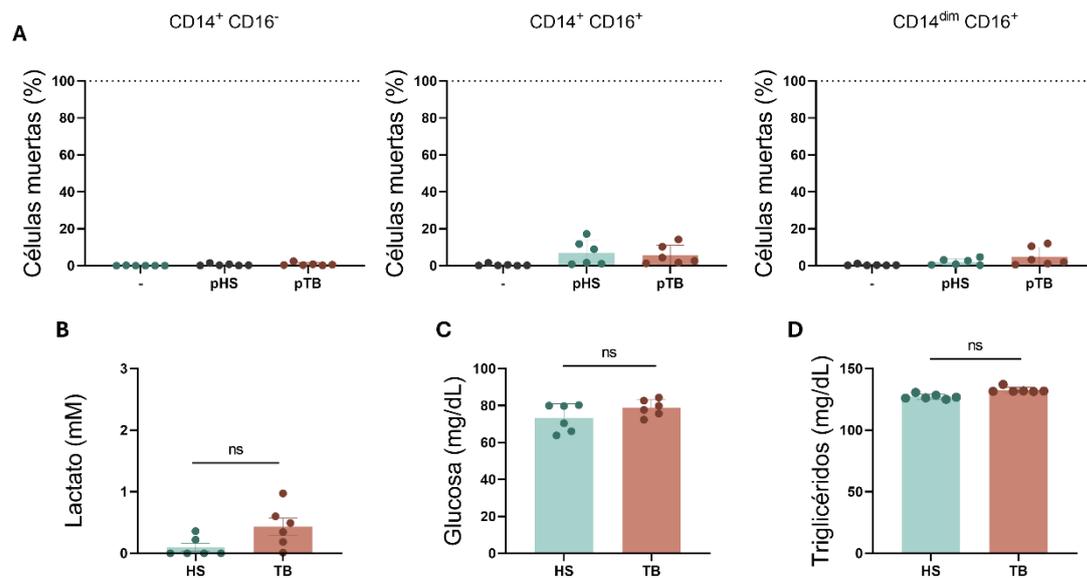
### Conclusiones parciales de la segunda parte

- Las BMDC adoptan un metabolismo glicolítico en respuesta a la infección con BCG.
- La inhibición de HIF1A limita la migración de células dendríticas a los ganglios linfáticos en ratones vacunados con BCG y la aparición de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  (evaluados en el bazo).
- Una menor capacidad migratoria de las BMDC podría impactar en el inicio de la respuesta adaptativa y su cinética.

### Capítulo III: estudio del mecanismo por los cuales la glicólisis exacerbada en los monocitos de pacientes con TB predispone a la generación de DCs con menor capacidad migratoria

#### Caracterización metabólica del plasma de pacientes con TB y su impacto en la viabilidad celular

Siendo que observamos que los monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB presentan una glicólisis exacerbada de forma basal, y que esto promueve la generación de Mo-DCs deficientes en su migración, decidimos abordar el mecanismo que gobierna este fenómeno. Para ello generamos un pool de plasmas de pacientes con TB, lo deconplementamos, y evaluamos su impacto sobre monocitos purificados de concentrados leucocitarios provenientes de donadores sanos (HS). En paralelo, generamos un pool de plasma de donadores sanos, para tener un pool de plasma heterólogo no asociado a enfermedad tuberculosa como control. En primera instancia, no notamos cambios significativos en la viabilidad celular de las distintas poblaciones de monocitos que fueron expuestas al pool de plasma de TB o de HS durante 1 hora (**Figura 30A**). Con el fin de determinar posibles contribuciones diferenciales de aportes nutricionales entre los *pools* de plasma de TB y de HS, comparamos la abundancia de algunos metabolitos relevantes. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la abundancia basal de glucosa, lactato y triglicéridos (**Figura 30B-D**).

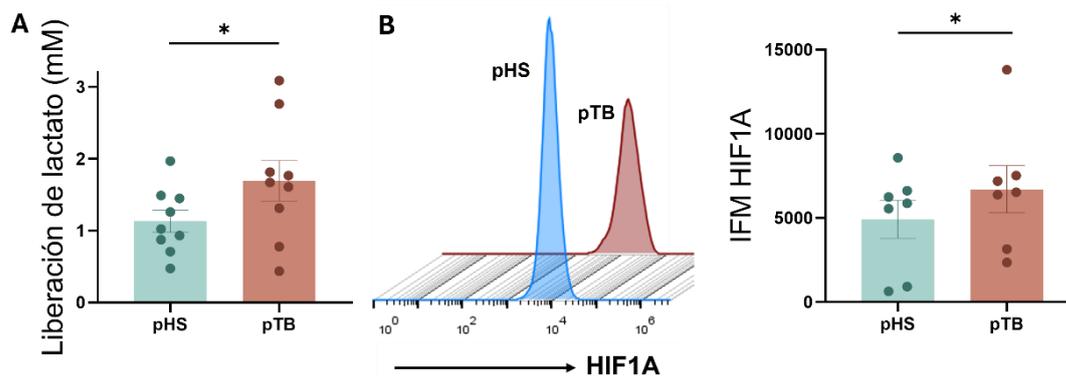


**Figura 30. Caracterización del pool de plasma de pacientes con tuberculosis (TB).**

Se generó un pool mezclando plasmas individuales de donadores sanos (pHS) (N = 6) y, por otro lado, pacientes con TB (pTB) (N = 6). **(A)** Viabilidad celular de los distintos subconjuntos de monocitos luego de ser expuestos durante 1 hora a pHS o pTB en una concentración 20% v/v final. **(B)** Determinación de lactato basal medida en los pools generados. **(C)** Concentración de glucosa en cada pool. **(D)** Concentración de triglicéridos presentes en el plasma. Los datos se representan en forma de gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa a un único individuo **(A)** o réplicas experimentales **(B-D)**; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

### El plasma tuberculoso induce la vía glicolítica en monocitos de donadores sanos

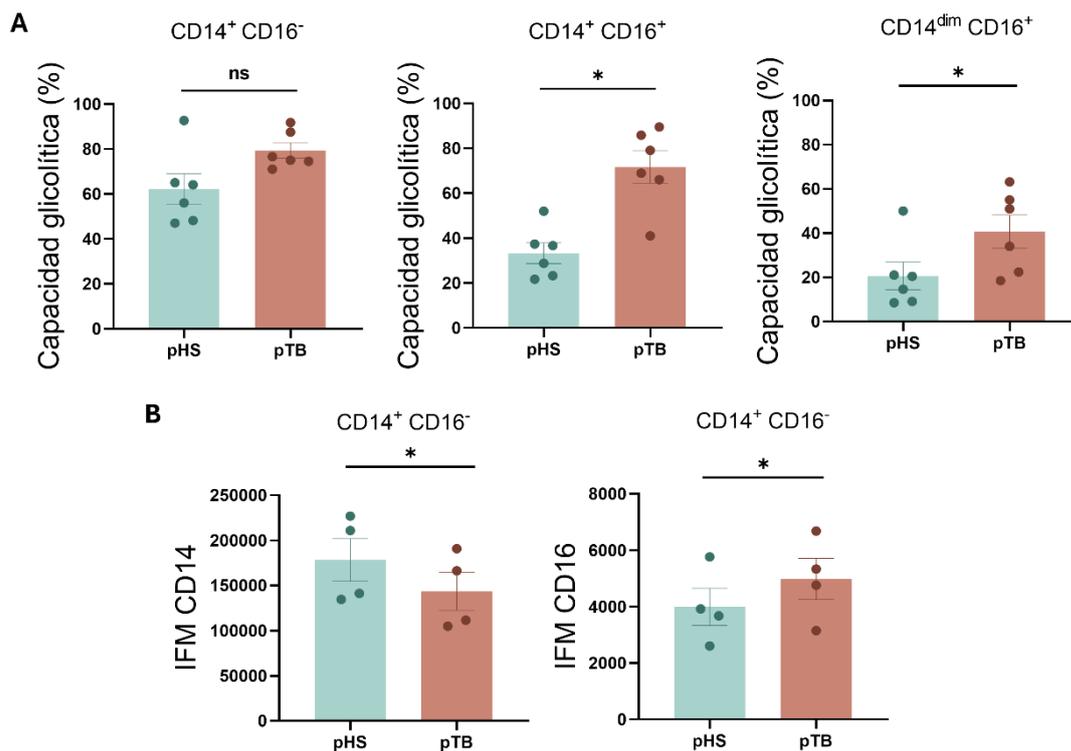
Con el objetivo de caracterizar el impacto del plasma de pacientes con TB en el metabolismo de monocitos de donadores sanos, expusimos monocitos durante una hora a un pool de plasma de pacientes con TB (pTB). Determinamos que el pTB aumenta la producción de lactato de monocitos, utilizando como control monocitos expuestos a un pool de plasma de donadores sanos (pHS) (**Figura 31A**). Al mismo tiempo, observamos que la exposición al pTB incrementa la expresión del factor de transcripción HIF1A (**Figura 31B**).



**Figura 31. El plasma de pacientes con tuberculosis (pTB) induce la glicólisis mediada por HIF1A en monocitos de dadores sanos.**

**(A-B)** Monocitos de dadores sanos fueron purificados a partir de concentrados leucocitarios e incubados con 20% v/v de un pool de plasma de dadores sanos o pTB durante 1 hora. **(A)** Producción de lactato medida en sobrenadantes de cultivo celular durante las 24 hrs. posteriores (N = 9). **(B)** Histogramas representativos de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de HIF1A medida por citometría de flujo. La cuantificación se muestra en el gráfico de la derecha (N = 7). La significancia estadística fue evaluada mediante la prueba T pareada (\*p<0,05). Los datos se representan en forma de gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa a un único individuo; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

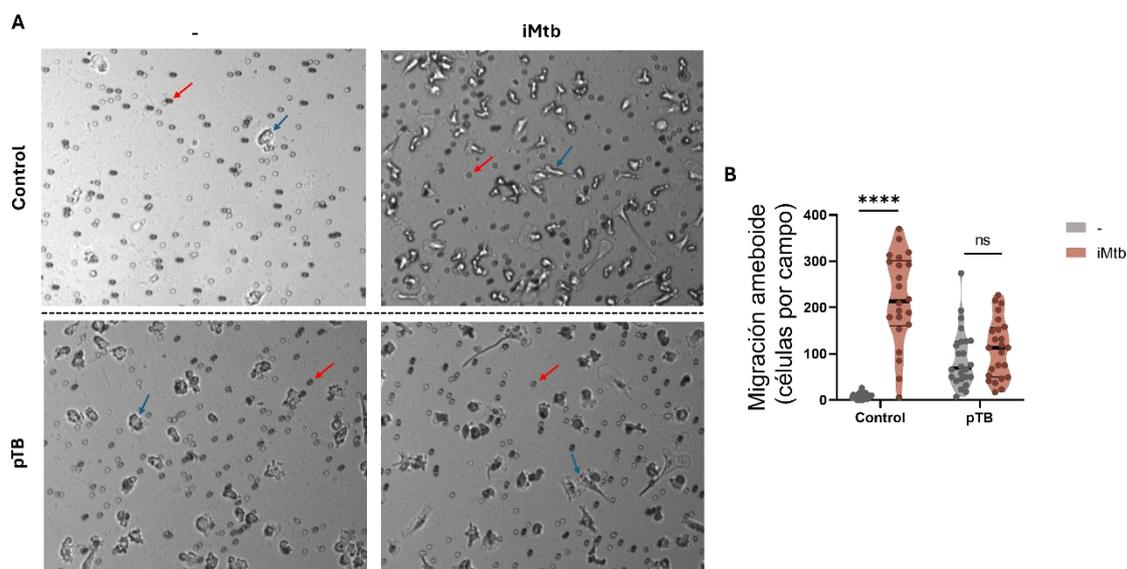
Por otro lado, evaluamos el metabolismo de estos monocitos a nivel celular, y encontramos que los monocitos expuestos al pTB incrementan su capacidad glicolítica en las poblaciones CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (**Figura 32A**). De forma interesante, vimos que el aumento de la capacidad glicolítica en monocitos CD16<sup>+</sup> está acompañada de un aumento en la expresión de este receptor en monocitos CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup>, situación similar a la observada en paciente con TB, donde se observa un aumento en el porcentaje de las poblaciones de monocitos CD16<sup>+</sup> (Balboa et al., 2011) (**Figura 32B**).



**Figura 32. El plasma de pacientes con tuberculosis (TB) aumenta la capacidad glicolítica en las poblaciones de monocitos CD16<sup>+</sup>.**

**(A)** Capacidad glicolítica medida mediante SCENITH de poblaciones de monocitos definidas por su expresión de CD14 y CD16 de dadores sanos expuestos a pHS o pTB (N = 6). **(B)** Intensidad de fluorescencia media de CD14 y CD16 en la población de monocitos CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> (N = 6). La significancia estadística fue evaluada mediante la prueba T pareada (\*p<0,05). Los datos se representan en forma de gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa células de un único individuo; se muestran las medias ± SEM.

Finalmente, diferenciamos monocitos expuestos al pTB o no hacia DCs y evaluamos su capacidad migratoria. Aquellas DCs que provenían de monocitos expuestos al pTB presentaron, en primera instancia, una migración basal en las DCs no estimuladas mayor respecto de la condición control. Esto es similar a lo observado en Dx-DCs y DCs de pacientes con TB. Además, mostraron una menor migración a través de matrices de colágeno en respuesta a iMtb respecto de DCs control (**Figura 33A y B**). Por ende, estos resultados indican que **la exposición de los monocitos de dadores sanos al pTB aumenta su capacidad glicolítica, repercutiendo en la generación de DCs migratorias**, similar a lo observado en monocitos de pacientes con TB.



**Figura 33. La exposición de monocitos al plasma de pacientes con tuberculosis (TB) genera células dendríticas (DCs) con baja capacidad migratoria.**

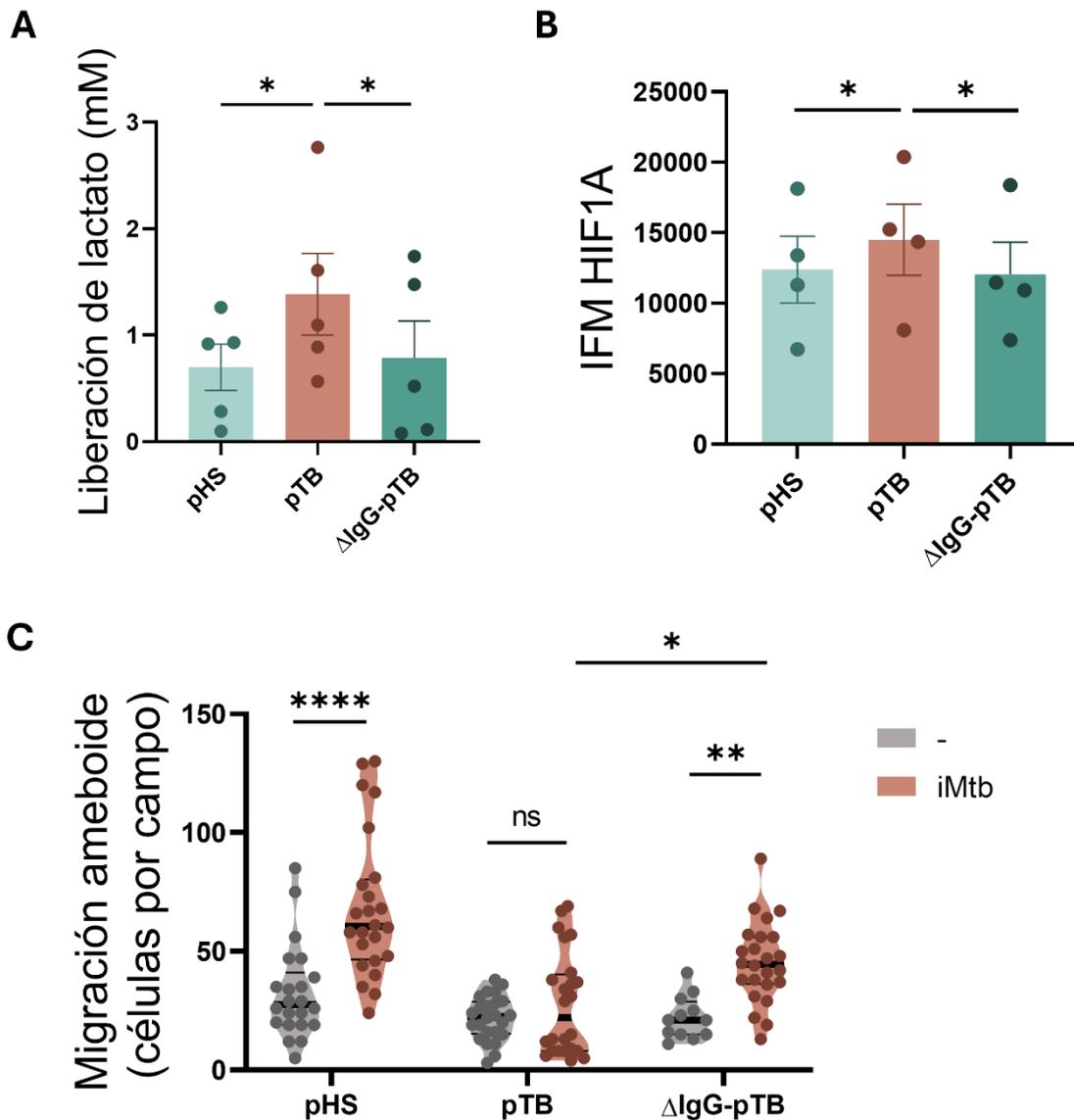
(A) Imágenes representativas de cada condición utilizadas para la cuantificación. Las flechas rojas indican poros de membrana del inserto y las azules marcan células. (B) Migración ameboidal tridimensional de DCs estimuladas o no con iMtb, cuyos monocitos fueron expuestos a pTB o no durante 1h. Las células dentro de la matriz se fijaron y tiñeron con DAPI. Se tomaron imágenes de la membrana de cada inserto y se contó células por campo. La significancia estadística fue evaluada mediante ANOVA anidado seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (\*\*\*\*p<0,0001). Los datos se representan en forma de *violin plots* en donde cada círculo representa número de células por foto; se muestran las medias  $\pm$  SEM.

### El plasma de pacientes con TB influye el metabolismo de monocitos CD16<sup>+</sup> a través de la vía IgG – receptor Fc CD16 (Fc $\gamma$ RIIIa)

Siendo que observamos un efecto diferencial del pTB en los subconjuntos CD16<sup>+</sup> exclusivamente, y considerando que CD16 es el receptor tipo III para la fracción Fc de la inmunoglobulinas (Ig)G o Fc $\gamma$ RIII (baja afinidad), nos propusimos evaluar si la vía IgG – CD16 estaba involucrada. Para ello depletamos el pTB de IgG total ( $\Delta$ IgG-pTB) utilizando microesferas de sefaroza acopladas a la Proteína G (con afinidad para IgG) y evaluamos su impacto en monocitos de donadores sanos. Encontramos que al depletar IgG, el pTB pierde su capacidad de inducir la producción de lactato (Figura 34A), al igual que de promover la expresión de HIF1A, sugiriendo que **el efecto metabólico del pTB en monocitos de donadores sanos requiere de la presencia de IgG (Figura 34B)**.

Para evaluar si la depleción de IgG puede impactar en la ulterior capacidad migratoria de las DCs generadas, realizamos ensayos de migración a través de matrices de colágeno a partir de DCs provenientes de monocitos tratados o no con  $\Delta$ IgG-pTB. Observamos que aquellas DCs

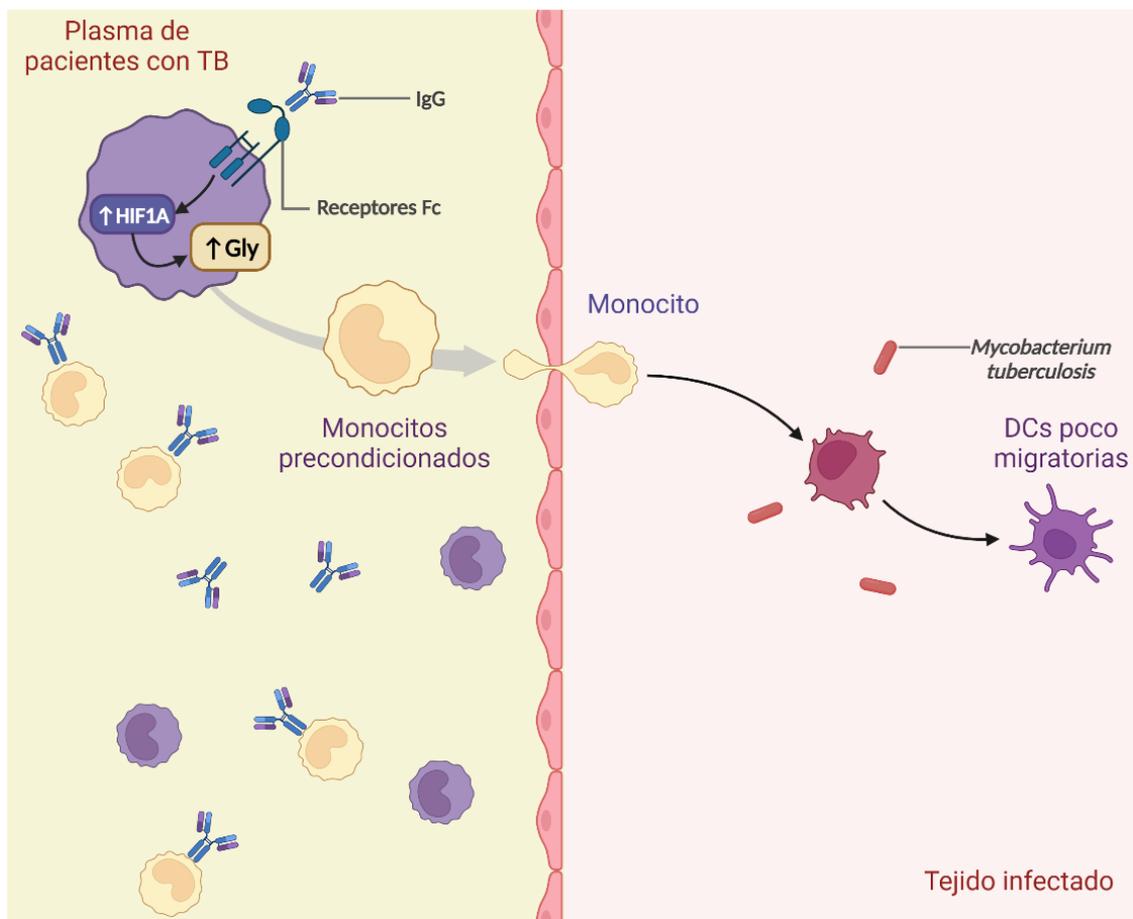
provenientes de monocitos tratados con  $\Delta$ IgG-pTB restauraron tanto su capacidad de aumentar la migración en respuesta a iMtb, así como también mostrando una mayor migración respecto de aquellas DCs que provenían de monocitos tratados con pTB. En conclusión, estos resultados sugieren que **la activación de la vía IgG – receptor Fc CD16 en los monocitos desempeñaría un rol al promover su actividad glicolítica y predisponerlos a la diferenciación de DCs poco migratorias.**



**Figura 34. El efecto del plasma tuberculoso es dependiente de la IgG.**

**(A-B)** Monocitos de dadores sanos fueron expuestos durante 1 hora al pool de plasma de dadores sanos (pHS), de pacientes con TB (pTB) o al pTB depletado de IgG total ( $\Delta$ IgG-pTB). **(A)** Liberación de lactato medida en el sobrenadante de cultivo (N = 5). **(B)** Intensidad media de fluorescencia de HIF1A medida por citometría de flujo (N = 4). **(C)** Migración ameboide tridimensional de DCs estimuladas o no con iMtb durante 24 hrs. cuyos monocitos fueron expuestos a pHS, pTB o IgG-pTB durante 1 hora. Las células dentro de la matriz se fijaron y tiñeron

con DAPI. Se tomaron imágenes de la membrana de cada inserto y se contó células por campo. La significancia estadística fue evaluada mediante **(A-B)** ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $*p < 0,05$ ). **(C)** ANOVA anidado seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,0001$ ). Los datos se representan en forma de **(A-B)** gráficos de dispersión, en los que cada círculo representa a un único individuo o **(C)** violín plots en donde cada círculo representa número de células por foto; se muestran las medias  $\pm$  SEM.



**Figura 35. Resumen gráfico del capítulo III.**

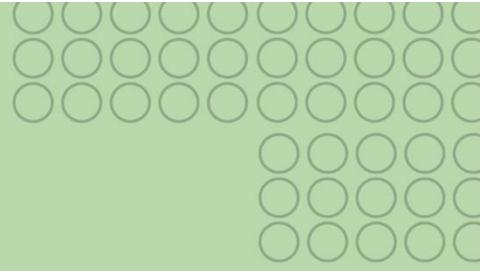
El plasma de pacientes con TB induce la vía glicolítica en monocitos de una forma IgG dependiente y esto los predispone a diferenciarse a DCs poco migratorias.

### Conclusiones parciales de la tercera parte

- El incremento del eje glicólisis/HIF1A de los monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB puede ser reproducido por la exposición al plasma tuberculoso.
- El plasma de TB promueve la adquisición del receptor CD16<sup>+</sup> en los monocitos CD16<sup>-</sup>, potencialmente contribuyendo al incremento en la abundancia relativa de esa población en los pacientes.

## Resultados

- La exposición de monocitos al plasma de pacientes con TB genera DCs con baja capacidad migratoria.
- El incremento del eje glicólisis/HIF1A en monocitos inducido por el plasma de TB junto con la posterior diferenciación a DCs poco migratorias requiere de la presencia de IgG en el plasma.



# DISCUSIÓN



### DISCUSIÓN

#### **Discusión de la primera parte: estudio de las alteraciones metabólicas que sufren las Mo-DCs durante la infección con Mtb**

En este estudio, demostramos el rol de la glicólisis mediada por HIF1A en promover la capacidad migratoria de las DCs en respuesta a Mtb. Nuestro enfoque de cuantificar el metabolismo de los monocitos *ex vivo* nos permitió revelar que aquellos monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB muestran una actividad glicolítica exacerbada, que puede resultar en la generación de DCs con una pobre capacidad migratoria en respuesta a iMtb. Nuestros resultados sugieren que, bajo condiciones inflamatorias crónicas tales como las que tienen lugar en pacientes con TB, los monocitos circulantes pueden ser metabólicamente preconditionados a diferenciarse en DCs con un bajo potencial migratorio (**Figura 25**).

Uno de los aspectos a destacar en esta discusión es porqué es relevante estudiar los mecanismos que regulan la migración de las DCs en respuesta a Mtb. En ese sentido, se ha demostrado que al infectar ratones vírgenes con Mtb, la acumulación inicial de células T CD4<sup>+</sup> activadas en los pulmones se retrasa, ocurriendo entre las semanas 2-3 post-infección (Reiley et al., 2008; Wolf et al., 2007). En este contexto, se ha demostrado que las Mo-DCs infectadas con Mtb que son reclutadas al sitio de infección exhiben una baja expresión de CCR7 y una migración deteriorada a ganglios linfáticos en comparación a Mo-DCs no infectadas (Harding et al., 2015). Adicionalmente, se ha encontrado que las Mo-DCs tienen un rol clave en el transporte de Ags de Mtb desde el pulmón a los ganglios linfáticos drenantes, donde las DCs convencionales presentan Ags a las células T vírgenes (Samstein et al., 2013). La capacidad migratoria de las DCs que responden es de vital importancia para la respuesta del hospedador a la infección con Mtb.

En este trabajo de tesis doctoral, observamos que la activación de Mo-DCs de dadores sanos con Mtb gatilla la vía glicolítica en dichas células, la cual promueve su capacidad migratoria en una forma dependiente de la actividad de HIF1A. Recientemente, se ha demostrado que la glicólisis es requerida para la migración de DCs murinas gatillada por CCR7 en respuesta a LPS (Everts et al., 2014; Guak et al., 2018; Y. Liu et al., 2019). También se ha reportado que la glicólisis es requerida para la migración de otras células inmunes como lo son los macrófagos (Semba et al., 2016) y células T regulatorias (Kishore et al., 2017). De forma consistente, mostramos que la inhibición de la glicólisis dependiente de HIF1A perjudica la migración de las Mo-DCs humanas frente a la estimulación con Mtb. La relación entre el metabolismo celular y el comportamiento migratorio está sustentada en estudios que elucidaron cómo la glicólisis puede ser mecánicamente

regulada por cambios en la arquitectura del citoesqueleto, impactando en última instancia sobre la actividad de enzimas glicolíticas que se encuentran en estrecho contacto con el citoesqueleto (Fernie et al., 2020; Park et al., 2020). Adicionalmente, se han descrito previamente conexiones interesantes entre el mecanismo celular de las DCs y su metabolismo, destacando el potencial de este último para alterar la biomecánica de las DCs, lo cual impacta en el control de su tráfico y, en consecuencia, de la activación de células T (Currivan et al., 2022). Sin embargo, estos estudios no alcanzaban aún contextos patológicos como la TB. En ese sentido, estudios enfocados en los mecanismos moleculares por los cuales las vías metabólicas impactan en la maquinaria responsable del movimiento celular en el contexto de la infección con TB son necesarios para diseñar intervenciones terapéuticas específicas.

Nuestra investigación indica que las DCs exhiben un incremento de la glicólisis producto de la estimulación o infección con Mtb. Este cambio metabólico es crucial para facilitar la migración celular a los ganglios linfáticos drenantes, un paso esencial para montar respuestas inmunes efectivas. No obstante, sigue siendo incierto si esta inducción de la glicólisis alcanza un umbral propicio para generar una respuesta inmune protectora en un contexto fisiológico, una cuestión que nuestros hallazgos no abordan de forma contundente, dado que no realizamos estudios del impacto de los cambios metabólicos sobre la inducción de la respuesta adaptativa en modelos *in vivo* de TB.

Adicionalmente, demostramos que las DCs tolerogénicas inducidas con DEX, así como también las DCs derivadas de monocitos de pacientes con TB, presentan una menor liberación de lactato y un tráfico deteriorado hacia la quemoquina CCL21 frente a la estimulación con Mtb; ambos fenotipos pudiendo ser restaurados mediante la estabilización de la expresión de HIF1A. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en abordar cómo el estado metabólico de los monocitos de pacientes con TB influencia la actividad migratoria de las DCs una vez diferenciadas. De acuerdo con nuestros resultados, el estado de activación del eje HIF1A/glicólisis en monocitos, podría predecir un fenotipo refractario a la diferenciación a DCs migratorias durante la TB. Con respecto al metabolismo de las DCs tolerogénicas, nuestros resultados son consistentes con trabajos previos que reportan que la tolerancia en DCs puede ser inducida por drogas que promueven la OXPHOS, tales como la vitamina D y la DEX (Basit & de Vries, 2019; Ferreira et al., 2009, 2012). Es interesante destacar que, si bien la migración de las DCs tolerogénicas no incrementa frente a la estimulación con Mtb, está aumentada bajo condiciones basales, lo cual coincide con información previa que muestra una alta capacidad migratoria de DCs putativamente tolerogénicas en estado estacionario, postulándose que dicha migración mediada por CCR7 contribuye a mantener la tolerancia (Ohl et al., 2004).

Ha sido ampliamente demostrado que las células inmunes pueden incrementar la glicólisis tras el reconocimiento a través de TLRs (Krawczyk et al., 2010b). Nuestro trabajo muestra que el reconocimiento por medio de TLR2 de tanto Mtb viable o irradiado es necesario para gatillar la glicólisis en las DCs, al menos a tiempos tempranos post estimulación. De hecho, incluso las DCs *bystander* aumentan su actividad en cultivos infectados con Mtb, lo que sugiere que Ags o debris micobacterianos presentes en el microambiente pueden ser suficientes para gatillar la glicólisis dependiente de TLR; o que, alternativamente, se producen mediadores solubles en respuesta a la unión de TLR2 que inducen la glicólisis en las DCs *bystander*. Siendo que la activación de la glicólisis e inducción de la migración a ganglios linfáticos inducida por Mtb en las DCs no condice plenamente con el desenlace de “respuesta inmune retrasada” que se observa en el marco de la infección tuberculosa, proponemos dos explicaciones: 1) como comentamos anteriormente, desconocemos si estos niveles de inducción de glicólisis y de migración a ganglios linfáticos por parte de las DCs en respuesta a Mtb son suficientes para desencadenar una respuesta esterilizante en el hospedador; 2) es posible que el destino de las DCs dependa mucho de la dosis de infección, ya que en nuestra experiencia, DCs expuestas a altas dosis de Mtb (>5 bacteria por DC), mueren. En el contexto de una infección natural *in vivo*, prevemos que DCs con diferentes niveles de infección coexistirán, algunas con una baja carga bacteriana que, de acuerdo con nuestros resultados, podrían gatillar la vía glicolítica y migrar, mientras que otras DCs altamente infectadas sería más probable que murieran (R. C. Ryan et al., 2011). También permanece por ser elucidado si una interacción persistente entre las DCs y Mtb podría llevar a una atenuación de la glicólisis en el tiempo, como fue reportado en macrófagos (Hackett et al., 2020). En este sentido, el estadio de la infección también parece tener un rol relevante en definir el tipo de contribución del eje glicólisis/HIF1A sobre el curso de la infección. Nuestros resultados demuestran que una infección crónica con Mtb conduce a un estado de los monocitos con una glicólisis exacerbada, la cual podría ser desencadenado por una prolongada y/o excesiva estimulación de TLRs debido a la presencia de ligandos en circulación, lo cual resultaría en DCs con una capacidad glicolítica exhausta. Esta hipótesis sobre los posibles factores que promueven la actividad glicolítica en los monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB se detalla en el capítulo III.

Además de la capacidad migratoria de las DCs, estudiamos el impacto de HIF1A sobre la adquisición del perfil maduro y la activación de células T. En ese sentido, a pesar de que las DCs estimuladas con iMtb en la presencia de un inhibidor de HIF1A exhibieron diferencias en cuanto a moléculas coestimuladoras y el perfil de citoquinas, estas células todavía eran capaces de activar células T CD4<sup>+</sup> que provenían de dadores PPD<sup>+</sup> en respuesta a iMtb.

Nuestros hallazgos contrastan con evidencia previa que demuestra que las DCs maduras inducidas con LPS inhiben la respuesta de células T mediante la activación de HIF1A en presencia de glucosa. Esta situación conduce a una mayor capacidad de activar células T en entornos de baja glucosa, como en la interfaz entre las DCs y las células T. Se propone que la activación de los linfocitos consume glucosa, generando un ambiente de privación de la misma, lo que permitiría a las DCs presentar de manera más efectiva los antígenos en ese contexto (Lawless et al., 2017). En este trabajo, no detectamos un impacto en la activación de las células T producto de la inhibición de HIF1A en las DCs, pero observamos una clara reducción en su capacidad migratoria, lo cual podría limitar o retrasar el encuentro entre las DCs y las células T *in vivo*, llevando a una pobre activación de las células T en los ganglios linfáticos. En este sentido, estudios en murinos han mostrado que la migración de las DCs correlaciona directamente con la proliferación de las células T (Martín-Fontecha et al., 2003). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que otras poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> no estudiadas en esta tesis (tales como las células T regulatorias), células T CD1-restrictas, y/o poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> puedan ser diferencialmente activadas por DCs estimuladas con iMtb que son deficientes en la actividad de HIF1A.

Dado que encontramos diferencias en el perfil metabólico y migratorio de las Mo-DCs provenientes de pacientes con TB comparadas con aquellas originadas a partir de monocitos de donadores sanos, decidimos explorar el metabolismo de las poblaciones de monocitos de ambos grupos experimentales. Hasta el momento, tres poblaciones diferentes de monocitos humanos han sido identificadas: monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup>), intermedios (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>), y no clásicos (CD14<sup>dim</sup>, CD16<sup>+</sup>) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Estas subpoblaciones de monocitos son fenotípica y funcionalmente distintas. Los monocitos clásicos activamente extravasan a tejido en respuesta a inflamación, donde se pueden diferenciar a macrófagos o DCs (Ginhoux & Jung, 2014); los monocitos intermedios son apropiados para la presentación de Ags, secreción de citoquinas, y diferenciación; y los monocitos no clásicos están involucrados en el complemento y la fagocitosis mediada por Fc y su función principal es la adhesión celular (Cros et al., 2010; Loon Wong et al., 2011). A diferencia de los monocitos no clásicos, las dos poblaciones de monocitos CD14<sup>+</sup> son conocidas por extravasar a tejido y, por lo tanto, actuar como precursores capaces de dar lugar a Mo-DCs en tejidos inflamados. Aun así, la capacidad de diferenciación a DCs de la población intermedia todavía no está bien definida en modelos *in vivo*. Previamente nuestro grupo de trabajo demostró que los monocitos de pacientes con TB generan DCs aberrantes, y que los monocitos CD16<sup>+</sup> generan DCs aberrantes luego del tratamiento con GM-CSF e IL-4 (Cougoule et al., 2018). En este trabajo de tesis doctoral, demostramos que la glicólisis parece jugar un rol

dual durante la diferenciación de las DCs a partir de monocitos, por un lado, siendo necesaria para la migración a ganglios linfáticos de las DCs completamente diferenciadas en respuesta a Mtb y, por el otro, llevando a DCs con una pobre capacidad migratoria en respuesta a iMtb si es activada durante el inicio de la diferenciación a DCs (**Figura 25**). En este sentido, las DCs de donadores sanos responden a iMtb induciendo un perfil glicolítico y migratorio, mientras que monocitos aislados de pacientes con TB exhiben un inusual estado glicolítico temprano que resulta en la posterior generación de DCs con una baja actividad glicolítica y migratoria en respuesta a Mtb. De forma similar, encontramos que las células CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB presentan un estado glicolítico activo, así como también, una elevado nivel de la expresión de HIF1A en comparación a su contraparte en la cohorte de sanos. Asimismo, mostramos que los monocitos de pacientes con TB no solo están enriquecidos en células CD16<sup>+</sup>, sino que también presentan un perfil de expresión de receptores de quemoquinas alterado (Balboa et al., 2011), demostrando que tanto fenotipo y función de una población determinada de monocitos pueden diferir en condiciones patológicas. Mientras que es difícil de determinar si un perfil glicolítico intensificado en monocitos puede limitar su diferenciación a DCs *in vivo*, evidenciamos que un incremento de la glicólisis mediada por HIF1A en precursores lleva a la generación de células con una baja capacidad de migrar en respuesta a CCL21 *in vitro*. En línea con esta observación, un estudio reciente reveló que ocurre un incremento significativo de la capacidad glicolítica durante las primeras 24 hrs de diferenciación hacia un fenotipo de DCs tolerogénicas, como el inducido por vitamina D3 (Adamik et al., 2022), destacando el rol perjudicial de la activación temprana de un perfil inflamatorio en precursores de DCs. Una posible explicación para estos efectos puede ser encontrada en la acumulación de lactato durante la diferenciación a DCs. La señalización del lactato en células inmunes lleva a alteraciones metabólicas en las DCs que las programa hacia un estado regulatorio (Manoharan et al., 2021) y se ha observado también que el lactato puede suprimir la diferenciación y maduración de las DCs (Wculek et al., 2019); por lo tanto, una actividad glicolítica excesiva en precursores puede resultar en DCs condicionadas hacia funciones regulatorias.

En conclusión, nuestros resultados ofrecen nuevas ideas de las vías inmunometabólicas involucradas en el tráfico de las DCs a ganglios linfáticos. Estos conocimientos podrían tener varias implicancias dependiendo de factores tales como el tiempo, tipo celular, y el lugar de la inducción del eje HIF1A/glicólisis. Por un lado, alimentando la actividad glicolítica mediada por HIF1A en DCs en estadios tempranos de la infección podría potencialmente mejorar la efectividad de estrategias preventivas para la TB. Cabe destacar el impacto significativo en estudios donde el número de DCs que llegan a

ganglio linfático demostró ser un factor crucial para el éxito de vacunaciones basadas en DCs (Martín-Fontecha et al., 2003). Por otro lado, la activación prematura de la glicólisis en precursores, como se observó en monocitos CD16<sup>+</sup> de pacientes con TB severa, podría perturbar el delicado balance necesario para una respuesta inmune óptima. Esta variabilidad es consistente con el paradigma de “demasiado mucho, demasiado poco”, como demuestran las funciones duales del IFN- $\gamma$  (Kumar, 2017) y TNF- $\alpha$  (Mootoo et al., 2009) en el contexto de la TB, en donde se han documentado efectos detrimentales para las citoquinas “protectoras” IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  ya sea cuando hay poca cantidad de las mismas o, paradójicamente, cuando están en exceso. También enfatiza la importancia de mantener un fino equilibrio en las respuestas inflamatorias. Este estudio sienta las bases para una mayor exploración del potencial impacto del eje glicólisis/HIF1A a nivel sistémico dentro del campo de la inflamación crónica contrastando con su rol en entornos locales durante la fase aguda de la infección. Al profundizar nuestros conocimientos, estos hallazgos tienen como objetivo guiar el desarrollo de estrategias terapéuticas y/o preventivas innovadoras para combatir la TB.

### **Discusión de la segunda parte: impacto de la modulación del eje glicólisis/HIF1A en las DCs sobre el inicio de la respuesta adaptativa contra micobacterias.**

En esta segunda sección del trabajo de tesis doctoral, presentamos evidencia del rol del eje glicólisis/HIF1A en el tráfico de las DCs hacia ganglio linfático durante la inmunización con BCG. Nuestro modelo consiste en la transferencia adoptiva de BMDC infectadas con BCG pretratadas o no con un inhibidor de la actividad del factor de transcripción HIF1A a ratones *naive*. Mediante este abordaje, demostramos que la inhibición de HIF1A en BMDC infectadas con BCG limita la migración de DCs a los ganglios linfáticos y resulta en un menor número de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  específicos para Ags micobacterianos en el bazo a tiempos tempranos. Si bien estos estudios son preliminares pudiendo robustecerse tras la adición de más tiempos experimentales de estudio a futuro, nuestros resultados sugieren que la manipulación del metabolismo de las DCs repercute en su actividad migratoria y que esto afectaría en el tiempo en el cual se induce la respuesta de células T CD4<sup>+</sup>.

De forma más detallada, observamos que la infección de BMDC obtenidas de ratones *naive* con BCG promueve la vía glicolítica en estas células. Esto es consistente con lo observado en DCs mieloides humanas CD1c<sup>+</sup> donde el desafío con BCG resulta en un incremento en la glicólisis y OXPHOS (Triglia et al., 2023). Si bien es necesario un estudio más amplio de la

remodelación metabólica que sufren las BMDC durante la infección, nuestros resultados sugieren una menor dependencia relativa de un metabolismo mitocondrial, concomitante a una mayor capacidad glicolítica. Sería interesante complementar estos estudios evaluando el metabolismo mitocondrial en términos absolutos, midiendo la tasa de consumo de oxígeno asociada a la respiración mitocondrial. En relación con el metabolismo lipídico, aunque se ha descrito un incremento de la FAO en una línea celular de macrófagos murinos durante la infección con BCG, y que la activación de esta vía está asociada a una mayor inflamación en el pulmón y mayor actividad proinflamatoria en macrófagos (J. Luo et al., 2024), otros estudios demuestran que tanto la vía de síntesis de ácidos grasos como la FAO no son requisitos indispensables para la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las BMDC o los macrófagos derivados de médula ósea en respuesta a la infección con BCG y la activación de células T *in vivo* (Stüve et al., 2018). Estas controversias destacan la diversidad en la remodelación metabólica que sufren las células inmunes dependiendo de su origen y tipo celular. Nuestros resultados fueron obtenidos en BMDC diferenciadas con GM-CSF e IL-4, y no hemos estimado la contribución de FAO de forma específica, sino de forma combinada junto con la contribución del metabolismo de aminoácidos mediante SCENITH, sin lograr evidenciar diferencias entre las BMDC infectadas o no con BCG.

Respecto de las BMDC, se ha reportado en los últimos años que el cultivo *in vitro* de BMDC con GM-CSF genera una mezcla heterogénea de células mieloides, comprendida entre DCs y macrófagos principalmente, y esto dificulta extraer conclusiones de este sistema respecto a los diferentes roles de las DCs y macrófagos frente a una infección micobacteriana (Helft et al., 2015). Si bien la utilización de IL-4 además de GM-CSF durante el proceso de diferenciación a BMDC mejora el rendimiento del cultivo en términos de pureza de células CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>, nuestro modelo de estudio utilizado continúa representando una mezcla heterogénea de células mieloides. En el marco de estudio propuesto en esta tesis doctoral, donde se busca evaluar la inducción inicial de la respuesta inmune adaptativa, la utilización de DCs residentes de pulmón en lugar de BMDC nos permitiría evaluar mecanismos más fisiológicos. A pesar de todo, las BMDC continúan siendo un modelo de estudio ampliamente utilizado debido a los grandes rendimientos en relación con número de células, facilitando su implementación en modelos de transferencia adoptiva de células.

Similar a lo descrito en la primera parte del trabajo para el caso de Mo-DCs expuestas a Mtb, las BMDC exhiben un incremento de la glicolisis producto de la infección con BCG y demostramos que la inducción de esta vía metabólica es necesaria para la migración celular a los ganglios linfáticos drenantes. Respecto de este punto, un estudio reciente reportó que la

capacidad migratoria de las DCs humanas CD1c<sup>+</sup> infectadas con BCG no depende de la glicólisis, sin embargo, estas conclusiones fueron extraídas utilizando el inhibidor 2-DG, lo cual afecta no solo a la glicólisis aeróbica, sino al metabolismo de la glucosa, incluida su contribución a la OXPHOS (Triglia et al., 2023).

De forma interesante, se ha propuesto que la ausencia de una inmunidad esterilizante inducida por las vacunas usadas contra la TB, como lo es la BCG, podría deberse a la activación retardada de las DCs y el consecuente retraso en la presentación antigénica y la activación de respuestas de células T CD4<sup>+</sup> inducidas por la vacunación (Griffiths et al., 2016), en ese sentido, nuestros resultados podrían profundizar el conocimiento sobre los factores que regulan la respuesta protectora en el marco de la inmunización por BCG. En los últimos años, los estudios sobre la migración de las DCs en el contexto de la infección con BCG estuvieron enfocados en DCs de la piel, debido a su relevancia para el tráfico de Ags a ganglios linfáticos en el contexto de la inoculación de la cepa vacunal de forma subcutánea (Bollampalli et al., 2015). Sin embargo, no hay estudios hasta el momento que evalúen los mecanismos que regulan la migración de las DCs que llevan BCG a los ganglios linfáticos. En este aspecto, nuestros resultados son pioneros en describir el vínculo entre la glicólisis y la actividad migratoria de DCs infectadas con BCG. Consideramos estos estudios, como los primeros estudios mecanísticos para sentar las bases para otros modelos fisiológicamente más relevantes que nos permitan modular la actividad de HIF1A sobre las poblaciones endógenas involucradas en el proceso de entrega de la bacteria a los ganglios.

Retomando el modelo experimental empleado en esta tesis, logramos efectivamente transferir BMDC infectadas con BCG tratadas o no con el inhibidor de HIF1A, y evaluar el impacto de una menor migración de las BMDC cargadas con BCG sobre la inducción de la respuesta adaptativa, evidenciada como respuesta de los esplenocitos frente a la estimulación *in vitro* con iMtb. Nuestros resultados muestran que la inhibición de HIF1A en BMDC infectadas con BCG limita el número de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  en el bazo a tiempos tempranos, sugiriendo un importante vínculo entre la migración dependiente del eje HIF1A/glicólisis en DCs y el inicio de la respuesta de las células T. Esto se encuentra en línea con lo reportado por trabajos previos, donde se demuestra que la magnitud y calidad de la activación de células T CD4<sup>+</sup> es proporcional al número de DCs que alcanzan los ganglios linfáticos (Celli et al., 2012; Martín-Fontecha et al., 2003). Evidencia que acompaña a los hallazgos obtenidos en la primera parte, siendo que no se observan diferencias en la frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ , pero sí en valores absolutos, lo que propone que la inhibición de la actividad de HIF1A no predispone la polarización de clones T hacia un perfil

diferencial. Sin embargo, nuestros resultados son preliminares y se requieren ensayos adicionales para extraer conclusiones más precisas. Consideramos que sería relevante para robustecer estos resultados:

- 1) Evaluar las células asociadas a BCG: a pesar de que está mayoritariamente aceptado que las DCs son las responsables principales de migrar desde el sitio de infección a los ganglios linfáticos para presentar antígenos a las células inmunes adaptativas, algunos estudios sugieren que otras células inmunes como neutrófilos, monocitos y macrófagos contribuyen al tráfico de la BCG (Abadie et al., 2005). Por lo tanto, con el fin de vincular directamente la actividad migratoria de las DCs al inicio de la respuesta inmune adaptativa, se necesita profundizar sobre la identidad de la población celular encargada del transporte de BCG a los ganglios linfáticos en el marco de la inmunización subcutánea.
- 2) Ampliar y profundizar el estudio del tipo de respuesta inmune inducida en los ganglios drenantes y en el bazo: si bien no observamos diferencias en cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ , es necesario expandir nuestro análisis a otras poblaciones efectoras, por ejemplo, a linfocitos T CD4<sup>+</sup> polifuncionales-IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>, población de células inducidas predominantemente en esquemas de vacunación con BCG durante la infancia, etapa donde la vacuna confiere protección, y que correlaciona negativamente con la inhibición del crecimiento bacteriano *in vitro* (Smith et al., 2016). Asimismo, siendo que no hay correlatos de protección confiables, sería deseable incluir otros parámetros tales como ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano inducido por células de los ganglios linfáticos y/o esplenocitos (MGIA, Jensen et al., 2017).
- 3) Ampliar la cinética de estudio: nuestros resultados muestran que al día 19, se observa un mayor número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  en aquellos ratones que recibieron BMDC infectadas con BCG, respecto de las que recibieron BMDC previamente tratadas con un inhibidor de la actividad de HIF1A. Sin embargo, es necesario incluir más tiempos experimentales al estudio. Esto permitiría determinar si aquellos ratones que recibieron las BMDC tratadas con PX-478 presentan, por ejemplo, un aumento en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  a tiempos más tardíos. Por otro lado, sería importante incluir moduladores que estabilicen HIF1A e intentar añadir tiempos más tempranos para lograr detectar diferencias en el inicio de la respuesta adaptativa.

En conclusión, los resultados de esta segunda parte del trabajo de tesis doctoral proveen, aunque de forma preliminar, conocimientos acerca de cómo la modulación de las vías metabólicas en DCs afecta el nexo entre la actividad migratoria y el inicio de la respuesta inmune inducida por la cepa vacunal BCG. Al realizar ensayos complementarios, consideramos que estos resultados podrían tener implicancia en el mejoramiento del desarrollo de

vacunas que confieran protección contra la TB durante la adultez, siendo que, hasta el momento, no hay evidencia que relacione la velocidad a la cual se desarrolla la inmunidad adaptativa en respuesta a BCG con su capacidad protectora. Los resultados de esta investigación podrían aportar información valiosa respecto a factores clave que puedan predecir protección.

### **Discusión de la tercera parte: estudio del mecanismo por los cuales la glicólisis exacerbada en los monocitos de pacientes con TB predispone a la generación de DCs con menor capacidad migratoria**

Como hemos mostrado en la primer parte de este trabajo, mientras que la activación del eje HIF1A/glicólisis es necesario para que las DCs adquieran un fenotipo migratorio, la activación de esta vía metabólica en monocitos de forma temprana puede actuar en detrimento de la capacidad migratoria de las DCs diferenciadas subsecuentemente. Por lo tanto, el objetivo de esta tercera parte de la tesis doctoral fue comenzar a elucidar los mecanismos que subyacen a la glicólisis exacerbada observada en los monocitos durante la TB. La hipótesis de trabajo fue que **el plasma de pacientes con TB activa el eje HIF1A/glicólisis en monocitos.**

En primera instancia, nuestros resultados muestran que la incubación de monocitos con un pool de plasma de pacientes con TB no afecta la viabilidad de estas células. Además, no encontramos diferencias en cuanto concentración de algunos metabolitos que podrían ser utilizado como fuente de carbono por los monocitos. Durante los últimos años, la abundancia de los metabolitos se ha abordado con el fin de identificar biomarcadores durante enfermedades que presentan una inflamación crónica (Amaral et al., 2013; J. M. Collins et al., 2018; Langley et al., n.d.; Tripathi et al., 2022a). En este sentido, se ha reportado que diferencias en los niveles de metabolitos circulantes puede influenciar la respuesta inmune innata a través de una reprogramación a nivel transcripcional (Tripathi et al., 2022b). Si bien nuestros resultados no muestran diferencias significativas en términos de concentraciones de lactato, glucosa y triglicéridos, sería óptimo ampliar el espectro de metabolitos evaluado.

Existe evidencia de que el plasma de pacientes con TB contribuye al fenotipo inmunopatológico que adoptan los monocitos durante el curso de la enfermedad. Nuestro grupo de trabajo ha detectado en el pasado que existe una asociación entre la proporción de monocitos CD16<sup>+</sup> y los niveles de TNF $\alpha$  en el plasma de pacientes con TB (Balboa et al., 2011). Más recientemente, otros trabajos donde utilizaron monocitos de dadores sanos cultivados en un medio suplementado con plasma de pacientes con TB o contactos cercanos no sintomáticos determinaron cambios la expresión de moléculas coestimuladoras y en la fosforilación de factores de transcripción. Observaron

que la exposición al plasma de TB en estos monocitos aumentaba la fosforilación de tanto el transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) 3 como STAT 5 (Ahor et al., 2023; Harelimana et al., 2022). En este sentido, nuestros resultados son los primeros en evaluar cómo el plasma de pacientes con TB impacta en el fenotipo metabólico de monocitos sanos. Vimos que el plasma de pacientes con TB aumenta la actividad de HIF1A y la producción de lactato respecto de monocitos que fueron expuestos a plasmas de dadores sanos. Al analizar el efecto del plasma a nivel de célula única, encontramos que este efecto sobre la capacidad glicolítica ocurre únicamente en las poblaciones de monocitos CD16<sup>+</sup>, recreando lo observado en muestras de pacientes con TB durante la primera parte del trabajo.

Además, observamos que el plasma de pacientes con TB predispone a monocitos de dadores sanos a diferenciarse, en presencia de GM-CSF e IL-4, en DCs con una pobre actividad migratoria. En relación con estos resultados, diversos estudios han evaluado cómo el microambiente tuberculoso que encuentran los monocitos al infiltrar el sitio de infección condiciona su posterior diferenciación. Nuestro grupo en el marco del laboratorio internacional asociado con el IPBS de Francia participó en la caracterización de factores presentes en el microambiente tuberculoso que promueven la adopción de un perfil inmunosupresor en monocitos de dadores sanos (Lastrucci et al., 2015). En particular, detectaron altos niveles de pSTAT3 acompañado de un incremento en la expresión de CD16 en los monocitos expuestos al microambiente tuberculoso. De forma interesante, los monocitos tratados con el medio condicionado de macrófagos infectados con Mtb eran propensos a generar macrófagos antiinflamatorios productores de IL-10 (Lastrucci et al., 2015). Además, se ha observado que DCs diferenciadas en presencia de suero de pacientes con TB exhiben un fenotipo alterado con una baja capacidad de estimular células T alogénicas (B. Wu et al., 2008). En particular, nuestro grupo de trabajo ha reportado que monocitos CD16<sup>+</sup> no logran adoptar un fenotipo de DCs de forma eficiente en presencia de GM-CSF e IL-4, y que la expansión de las poblaciones CD16<sup>+</sup> de monocitos en sangre periférica de pacientes con TB está asociada al deterioro de la generación de DCs (Balboa et al., 2013a). Dichos datos destacan la importancia de las poblaciones CD16<sup>+</sup> de monocitos en la inmunopatología de la TB y su posterior impacto en distintos tipos celulares una vez diferenciados a partir de estos precursores. En relación con lo antedicho, nuestros resultados sugieren una promoción de la transición hacia monocitos no clásicos, evidenciada por la adquisición del receptor CD16 y la disminución de la expresión de CD14, efectos que se producen en tan solo una hora de exposición al plasma de pacientes con TB a partir de monocitos clásicos de individuos sanos. Las células mieloides supresoras (MSC) comprenden neutrófilos y monocitos activados patológicamente con una potente

actividad inmunosupresora. La activación clásica de las células mieloides tiene lugar en respuesta a patógenos y daño tisular y esta principalmente gatillado por DAMPs, PAMPs y la activación de receptores TLR. Sin embargo, una activación patológica ocurre cuando existe una estimulación persistente del compartimiento de células mieloides debido a la presencia prolongada de señales inflamatorias como ocurre en patologías como cáncer, infecciones o inflamación y enfermedades autoinmunes. En este aspecto, aunque no es frecuente encontrar micobacterias circulantes en casos de la TB pulmonar, se ha demostrado que existen Ags micobacterianos en el torrente sanguíneo (Ruiz-Sánchez et al., 2020). Estos Ags pueden ser liberados por las micobacterias presentes en los pulmones a través de su sistema de secreción, vesículas producidas por Mtb, o bien por micobacterias muertas que son liberadas por células inmunes necróticas o por vesículas extracelulares de células inmunes infectadas (Ruiz-Sánchez et al., 2020). En este contexto, algunos de estos antígenos funcionan como ligandos para los receptores TLR, como el ESAT-6 (C. Liu et al., 2017) y el LAM (Brock et al., 2020), los cuales activan señales a través de los TLR2/1 o TLR6 (Faridgozar & Nikoueinejad, 2017). También se encuentra la proteína de choque térmico 65 (HSP65) (Flores et al., 2011), que señala a través del TLR4. Además de la participación de los ligandos derivados de las micobacterias, se ha observado un incremento en los niveles circulantes de LPS (un ligando del TLR4) en pacientes con tuberculosis pulmonar avanzada (Feruglio et al., 2013; Gallucci et al., 2021; Juffermans et al., 1998.). Por lo tanto, la exposición crónica de los monocitos a estas moléculas circulantes durante la TB podría explicar la adquisición de un fenotipo inmunosupresor durante la enfermedad, similares a los observados en MSC. De forma complementaria, se ha demostrado que agonistas como Pam3CysSK4 y LPS promueven la glicólisis en monocitos a través de los receptores TLR2 y 4, respectivamente (Lachmandas et al., 2016), lo que probablemente contribuye a la activación prematura de la glicólisis observada en los monocitos de pacientes con TB. De forma interesante, nuestro grupo de trabajo ha descrito previamente que los monocitos CD16<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes con TB presentan una mayor expresión de los receptores TLR2 y TLR4 respecto de monocitos CD16<sup>-</sup> (Balboa et al., 2011), lo que podría indicar una mayor susceptibilidad de estas poblaciones a ligandos circulantes y, por lo tanto, explicar una glicólisis exacerbada únicamente en los monocitos CD16<sup>+</sup> durante la TB.

En este trabajo de tesis doctoral, decidimos enfocarnos en evaluar un potencial rol de la activación vía el receptor CD16 en promover la glicólisis en los monocitos CD16<sup>+</sup>. La familia de receptores Fc que se unen a IgG se encuentra ampliamente expresada en células de origen hematopoyético y consiste en un receptor inhibitorio y varios activatorios que difieren en afinidad y especificidad para las distintas subclases de inmunoglobulinas. En

células de la inmunidad innata, estos receptores definen un umbral para la activación celular por inmunocomplejos (Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Ejemplos importantes de respuestas efectoras reguladas por los receptores Fc son el proceso de fagocitosis, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la liberación de mediadores inflamatorios. La interacción receptores Fc-anticuerpos es influenciada por las citoquinas presentes en el microambiente, las cuales impactan en los niveles de expresión de receptores inflamatorios o inhibitorios. En este sentido, se ha descrito la capacidad de citoquinas o mediadores inflamatorios como IFN- $\gamma$ , TNF y LPS de aumentar la expresión de receptores Fc activatorios, lo que podría representar una retroalimentación positiva que ocurre durante etapas crónicas de la enfermedad tuberculosa (Nimmerjahn & Ravetch, 2006). Esto está en línea con lo reportado en monocitos de pacientes con TB, donde no solo presentan un incremento de la expresión de CD16, sino que también poseen mayores niveles del receptor Fc de alta afinidad CD64 (Balboa et al., 2011; Gatti et al., 2020). Nuestros resultados sugieren que el efecto del plasma de pacientes con TB sobre monocitos sanos es dependiente de IgG, lo que podría explicar una mayor susceptibilidad de las poblaciones CD16<sup>+</sup>. Sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios para determinar si este efecto es mediado exclusivamente por el receptor CD16 o si otros receptores Fc se encuentran involucrados. Asimismo, resta por conocer la naturaleza de los anticuerpos involucrados en mediar el efecto a través del CD16. Consideramos que podrían ser anticuerpos antimicobacterianos; sin embargo, en el caso de la TB, numerosos estudios han reportado la detección de autoanticuerpos como un epifenómeno asociado a la enfermedad (Belyaeva et al., 2022). Por lo tanto, también sería valioso explorar esta posibilidad, especialmente, teniendo en cuenta que se ignora por completo el papel de los autoanticuerpos en la fisiopatología de la TB.

Dentro de las perspectivas que consideramos relevantes para esta sección de resultados se incluye:

- 1) Estudio de la implicancia de receptores TLR y potencial desarrollo de estrategias terapéuticas: Si bien se han desarrollado moléculas capaces de inhibir la señalización de los TLRs como terapias prometedoras para enfermedades inflamatorias (Gao et al., 2017), consideramos que un enfoque que logre inhibir dicha señalización en los precursores podría afectar la funcionalidad de dicha vía en las DCs diferenciadas, en las cuales hemos demostrado que la activación de la glicólisis inducida por Mtb depende de TLR2. Por lo tanto, proponemos intervenir en la modulación de la señalización de los TLRs, mediante la neutralización de los ligandos circulantes a través de la transferencia de TLRs solubles. Estas proteínas solubles se consideran estructuralmente idénticas a sus homólogas unidas a la membrana, pero no

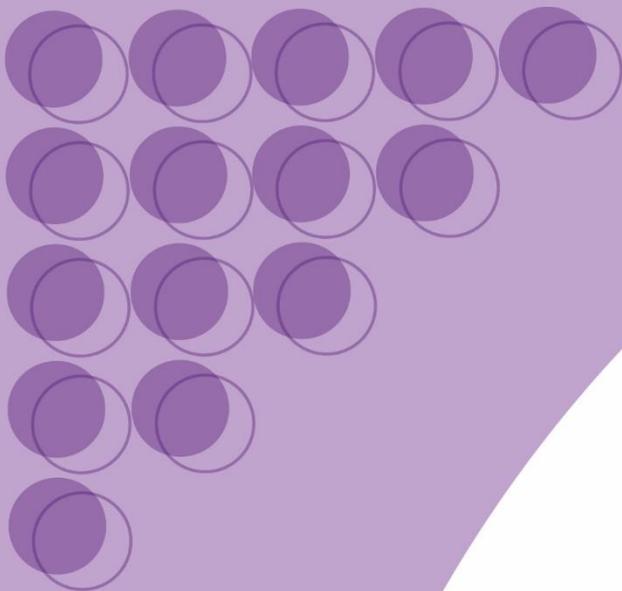
participan en la vía de señalización los TLRs, pero sí reducen las respuestas inflamatorias al competir con los TLRs por los ligandos (Henrick et al., 2016).

- 2) Evaluar cómo una glicólisis exacerbada en monocitos conduce a una pobre diferenciación en DCs: recientemente se ha reportado que un incremento en la activación de la glicólisis o OXPHOS correlaciona con cambios en la metilación del DNA en pacientes con TB, poniendo de manifiesto una interacción entre el metabolismo celular y modificaciones epigenéticas (Abhimanyu et al., 2024). En este sentido, proponemos que la glicólisis afecte al proceso de diferenciación ya sea: A) induciendo cambios epigenéticos en monocitos que lleven a la generación de DCs aberrantes, por ejemplo, promoviendo la transición de monocitos de CD16<sup>-</sup> a CD16<sup>+</sup>, o B) generando modificaciones epigenéticas que lleven a una activación persistente de la vía glicolítica en monocitos. En relación con esta última hipótesis, se ha demostrado que durante la diferenciación de monocitos a DCs en condiciones normales, durante las primeras 24 hrs de estimulación con GM-CSF e IL-4, los monocitos presentan un incremento en su dependencia mitocondrial, lo cual está acompañado de una disminución de la capacidad glicolítica (Adamik et al., 2022). En este aspecto, la persistencia de la glicólisis durante una inflamación crónica podría afectar el proceso de diferenciación a DCs.

En conclusión, los resultados de esta tercera parte del trabajo de tesis doctoral proveen conocimientos acerca de los mecanismos por los cuales la glicólisis exacerbada en los monocitos de pacientes con TB predispone a la generación de DCs con menor capacidad migratoria. La profundización de estos mecanismos novedosos que agravan el cuadro patológico de pacientes con TB en estadios crónicos podría aportar enfoques innovadores para mejorar estrategias preventivas y/o terapéuticas contra la TB.

### CONCLUSIONES

- En las Mo-DCs expuestas a Mtb se produce un cambio metabólico hacia la glicólisis aeróbica dependiente de la actividad del factor de transcripción HIF1A.
- La glicólisis mediada por HIF1A es necesaria para la migración eficiente de las DCs a los ganglios linfáticos y repercute en la cinética de inducción de la respuesta inmune adaptativa.
- El deterioro de la capacidad migratoria de las DCs tolerogénicas estimuladas por iMtb o de las DCs derivadas de pacientes con TB puede restablecerse mediante la estabilización de HIF1A.
- La TB se asocia a un aumento de la activación del perfil glicolítico de los monocitos CD16<sup>+</sup> circulantes.
- Esta activación de la glicólisis es dependiente de la IgG presente en el plasma de pacientes con TB.
- El estado glicolítico activado de los monocitos de pacientes con TB conduce a la generación de DCs con baja motilidad en respuesta a Mtb.



# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P. J. M., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B., & Winter, N. (2005). Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*, *106*(5), 1843–1850. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1281>
- Abhimanyu, Longlax, S. C., Nishiguchi, T., Ladki, M., Sheikh, D., Martinez, A. L., Mace, E. M., Grimm, S. L., Caldwell, T., Portillo Varela, A., Sekhar, R. V., Mandalakas, A. M., Mlotshwa, M., Ginidza, S., Cirillo, J. D., Wallis, R. S., Netea, M. G., van Crevel, R., Coarfa, C., & DiNardo, A. R. (2024). TCA metabolism regulates DNA hypermethylation in LPS and *Mycobacterium tuberculosis*-induced immune tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *121*(41). <https://doi.org/10.1073/pnas.2404841121>
- Adamik, J., Munson, P. V., Hartmann, F. J., Combes, A. J., Pierre, P., Krummel, M. F., Bendall, S. C., Argüello, R. J., & Butterfield, L. H. (2022). Distinct metabolic states guide maturation of inflammatory and tolerogenic dendritic cells. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32849-1>
- Ahor, H. S., Schulte, R., Adankwah, E., Harelimana, J. D. D., Minadzi, D., Acheampong, I., Vivekanandan, M. M., Aniagyei, W., Yeboah, A., Arthur, J. F., Lamptey, M., Abass, M. K., Kumbel, F., Osei-Yeboah, F., Gawusu, A., Debrah, L. B., Owusu, D. O., Debrah, A., Mayatepek, E., ... Jacobsen, M. (2023). Monocyte pathology in human tuberculosis is due to plasma milieu changes and aberrant STAT signalling. *Immunology*, *170*(1), 154–166. <https://doi.org/10.1111/imm.13659>
- Amaral, J. J., Antunes, L. C. M., de Macedo, C. S., Mattos, K. A., Han, J., Pan, J., Candéa, A. L. P., Henriques, M. das G. M. O., Ribeiro-Alves, M., Borchers, C. H., Sarno, E. N., Bozza, P. T., Finlay, B. B., & Pessolani, M. C. V. (2013). Metabonomics Reveals Drastic Changes in Anti-Inflammatory/Pro-Resolving Polyunsaturated Fatty Acids-Derived Lipid Mediators in Leprosy Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002381>
- Argentina, L. (n.d.). *Tuberculosis y lepra*.
- Argüello, R. J., Combes, A. J., Char, R., Gigan, J. P., Baaziz, A. I., Bousiquot, E., Camosseto, V., Samad, B., Tsui, J., Yan, P., Boissonneau, S., Figarella-Branger, D., Gatti, E., Tabouret, E., Krummel, M. F., & Pierre, P. (2020). SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy

- Metabolism with Single-Cell Resolution. *Cell Metabolism*, 32(6), 1063–1075.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.11.007>
- Balboa, L., Barrios-Payan, J., González-Domínguez, E., Lastrucci, C., Lugo-Villarino, G., Mata-Espinoza, D., Schierloh, P., Kviatcovsky, D., Neyrolles, O., Maridonneau-Parini, I., Sánchez-Torres, C., Sasiain, M. del C., & Hernández-Pando, R. (2015). Diverging biological roles among human monocyte subsets in the context of tuberculosis infection. *Clinical Science*, 129(4), 319–330. <https://doi.org/10.1042/CS20150021>
- Balboa, L., Kviatcovsky, D., Schierloh, P., García, M., de la Barrera, S., & Sasiain, M. del C. (2016a). Monocyte-derived dendritic cells early exposed to Mycobacterium tuberculosis induce an enhanced T helper 17 response and transfer mycobacterial antigens. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(7), 541–553. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.06.004>
- Balboa, L., Kviatcovsky, D., Schierloh, P., García, M., de la Barrera, S., & Sasiain, M. del C. (2016b). Monocyte-derived dendritic cells early exposed to Mycobacterium tuberculosis induce an enhanced T helper 17 response and transfer mycobacterial antigens. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(7), 541–553. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.06.004>
- Balboa, L., Romero, M. M., Basile, J. I., Sabio y García, C. A., Schierloh, P., Yokobori, N., Geffner, L., Musella, R. M., Castagnino, J., Abbate, E., de la Barrera, S., Sasiain, M. C., & Alemán, M. (2011). Paradoxical role of CD16+CCR2+CCR5+ monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(1), 69–75. <https://doi.org/10.1189/jlb.1010577>
- Balboa, L., Romero, M. M., Laborde, E., Sabio y García, C. A., Basile, J. I., Schierloh, P., Yokobori, N., Musella, R. M., Castagnino, J., de la Barrera, S., Sasiain, M. C., & Alemán, M. (2013a). Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: Role of p38 MAPK. *European Journal of Immunology*, 43(2), 335–347. <https://doi.org/10.1002/eji.201242557>
- Balboa, L., Romero, M. M., Laborde, E., Sabio y García, C. A., Basile, J. I., Schierloh, P., Yokobori, N., Musella, R. M., Castagnino, J., de la Barrera, S., Sasiain, M. C., & Alemán, M. (2013b). Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: Role of p38 MAPK. *European Journal of Immunology*, 43(2), 335–347. <https://doi.org/10.1002/eji.201242557>
- Balboa, L., Romero, M. M., Yokobori, N., Schierloh, P., Geffner, L., Basile, J. I., Musella, R. M., Abbate, E., De La Barrera, S., Sasiain, M. C., & Alemán, M. (2010). Mycobacterium tuberculosis impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile. *Immunology and Cell Biology*, 88(7), 716–726. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.22>

- Barham, D., & Trinder, P. (1972). An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *The Analyst*, 97(1151), 142–145. <https://doi.org/10.1039/an9729700142>
- Barnes, P. F., Yang, Z., Pogoda, J. M., Preston–Martin, S. P., Jones, B. E., Otaña, M., Knowles, L., Harvey, S., Eisenach, K. D., & Cave, M. D. (1999). Foci of tuberculosis transmission in central Los Angeles. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159(4 1), 1081–1086. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.4.9807153>
- Basit, F., & de Vries, I. J. M. (2019). Dendritic Cells Require PINK1-Mediated Phosphorylation of BCKDE1 $\alpha$  to Promote Fatty Acid Oxidation for Immune Function. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02386>
- beckman1994. (n.d.).
- Belyaeva, I. V., Kosova, A. N., & Vasiliev, A. G. (2022). Tuberculosis and Autoimmunity. In *Pathophysiology* (Vol. 29, Issue 2, pp. 298–318). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathophysiology29020022>
- Bhandari, T., & Nizet, V. (2014). Hypoxia-Inducible Factor (HIF) as a Pharmacological Target for Prevention and Treatment of Infectious Diseases. *Infectious Diseases and Therapy*, 3(2), 159–174. <https://doi.org/10.1007/s40121-014-0030-1>
- Bhatt, K., Hickman, S. P., & Salgame, P. (2004). Cutting Edge: A New Approach to Modeling Early Lung Immunity in Murine Tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 172(5), 2748–2751. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2748>
- Blanc, L., Gilleron, M., Prandi, J., Song, O. ryul, Jang, M. S., Gicquel, B., Drocourt, D., Neyrolles, O., Brodin, P., Tiraby, G., Vercellone, A., & Nigou, J. (2017). Mycobacterium tuberculosis inhibits human innate immune responses via the production of TLR2 antagonist glycolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(42), 11205–11210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707840114>
- Blouin, C. C., Pagé, E. L., Soucy, G. M., & Richard, D. E. (2004). Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: Implication of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Blood*, 103(3), 1124–1130. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2427>
- Bollampalli, V. P., Harumi Yamashiro, L., Feng, X., Bierschenk, D., Gao, Y., Blom, H., Henriques–Normark, B., Nylén, S., & Rothfuchs, A. G. (2015). BCG Skin Infection Triggers IL-1R–MyD88–Dependent Migration of EpCAMlow CD11bhigh Skin Dendritic cells to Draining Lymph Node During CD4+ T-Cell

- Priming. *PLoS Pathogens*, 11(10).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005206>
- Braverman, J., Sogi, K. M., Benjamin, D., Nomura, D. K., & Stanley, S. A. (2016). HIF-1 $\alpha$  Is an Essential Mediator of IFN- $\gamma$ -Dependent Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 197(4), 1287–1297. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600266>
- Brock, M., Hanlon, D., Zhao, M., & Pollock, N. R. (2020). Detection of mycobacterial lipoarabinomannan in serum for diagnosis of active tuberculosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 96(2). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114937>
- Bruick, R. K., & McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, 294(5545), 1337–1340. <https://doi.org/10.1126/science.1066373>
- Cairns, R. A., Papandreou, I., Sutphin, P. D., & Denko, N. C. (2007). *Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0611662104](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0611662104)
- Cala-De Paepe, D., Layre, E., Giacometti, G., Garcia-Alles, L. F., Mori, L., Hanau, D., De Libero, G., De La Salle, H., Puzo, G., & Gilleron, M. (2012). Deciphering the role of CD1e protein in mycobacterial phosphatidyl-myo-inositol mannosides (PIM) processing for presentation by CD1b to T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 31494–31502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386300>
- Carlin, L. M., Stamatiades, E. G., Auffray, C., Hanna, R. N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C. C., Cook, H. T., Diebold, S., & Geissmann, F. (2013). Nr4a1-dependent Ly6Clow monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*, 153(2), 362–375. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.010>
- Castaño, D., García, L. F., & Rojas, M. (2011). Increased frequency and cell death of CD16 + monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis*, 91(5), 348–360. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.04.002>
- Celli, S., Day, M., Müller, A. J., Molina-Paris, C., Lythe, G., & Bousso, P. (2012). *How many dendritic cells are required to initiate a T-cell response?* <https://doi.org/10.1182/blood-2012>
- Chackerian, A. A., Alt, J. M., Perera, T. V., Dascher, C. C., & Behar, S. M. (2002). Dissemination of Mycobacterium tuberculosis is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infection and Immunity*, 70(8), 4501–4509. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4501-4509.2002>

- Chandra, P., Grigsby, S. J., & Philips, J. A. (2022). Immune evasion and provocation by *Mycobacterium tuberculosis*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Issue 12, pp. 750–766). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00763-4>
- Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J., & Gusovsky, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 274(16), 10689–10692. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.10689>
- Codo, A. C., Davanzo, G. G., Monteiro, L. de B., de Souza, G. F., Muraro, S. P., Virgilio-da-Silva, J. V., Prodonoff, J. S., Carregari, V. C., de Biagi Junior, C. A. O., Crunfli, F., Jimenez Restrepo, J. L., Vendramini, P. H., Reis-de-Oliveira, G., Bispo dos Santos, K., Toledo-Teixeira, D. A., Parise, P. L., Martini, M. C., Marques, R. E., Carmo, H. R., ... Moraes-Vieira, P. M. (2020). Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 $\alpha$ /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metabolism*, 32(3), 437–446.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.007>
- Collins, A. C., Cai, H., Li, T., Franco, L. H., Li, X. D., Nair, V. R., Scharn, C. R., Stamm, C. E., Levine, B., Chen, Z. J., & Shiloh, M. U. (2015). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host and Microbe*, 17(6), 820–828. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.005>
- Collins, J. M., Walker, D. I., Jones, D. P., Tukvadze, N., Liu, K. H., Tran, V. T., Uppal, K., Frediani, J. K., Easley, K. A., Shenvi, N., Khadka, M., Ortlund, E. A., Kempker, R. R., Blumberg, H. M., & Ziegler, T. R. (2018). High-resolution plasma metabolomics analysis to detect *Mycobacterium tuberculosis* associated metabolites that distinguish active pulmonary tuberculosis in humans. *PLoS ONE*, 13(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205398>
- Cooper, A. M. (2009). Cell-mediated immune responses in tuberculosis. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 27, pp. 393–422). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132703>
- Corcoran, S. E., & O'Neill, L. A. J. (2016). HIF1 $\alpha$  and metabolic reprogramming in inflammation. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 126, Issue 10, pp. 3699–3707). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI84431>
- Cougoule, C., Lastrucci, C., Guet, R., Mascarau, R., Meunier, E., Lugo-Villarino, G., Neyrolles, O., Poincloux, R., & Maridonneau-Parini, I. (2018). Podosomes, but not the maturation status, determine the protease-dependent 3D migration in human dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00846>

- Court, N., Vasseur, V., Vacher, R., Frémond, C., Shebzukhov, Y., Yeremeev, V. V., Maillet, I., Nedospasov, S. A., Gordon, S., Fallon, P. G., Suzuki, H., Ryffel, B., & Quesniaux, V. F. J. (2010). Partial Redundancy of the Pattern Recognition Receptors, Scavenger Receptors, and C-Type Lectins for the Long-Term Control of Mycobacterium tuberculosis Infection . *The Journal of Immunology*, 184(12), 7057–7070. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000164>
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B. E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V. H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G. S., Gerber, H. P., Ferrara, N., & Johnson, R. S. (2003). HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, 112(5), 645–657. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00154-5)
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J. P., D’Cruz, D., Casanova, J. L., Trouillet, C., & Geissmann, F. (2010). Human CD14<sup>dim</sup> Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity*, 33(3), 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>
- Currivan, E., Finlay, D., & Moreira, D. (2022). Dendritic cells metabolism: a strategic path to improve antitumoral DC vaccination. In *Clinical and Experimental Immunology* (Vol. 208, Issue 2, pp. 193–201). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac048>
- de Lima Thomaz, L., Peron, G., Oliveira, J., da Rosa, L. C., Thomé, R., & Verinaud, L. (2018). The impact of metabolic reprogramming on dendritic cell function. In *International Immunopharmacology* (Vol. 63, pp. 84–93). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.07.031>
- Del Prete, A., Zaccagnino, P., Di Paola, M., Saltarella, M., Oliveros Celis, C., Nico, B., Santoro, G., & Lorusso, M. (2008). Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(7), 1443–1451. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.037>
- Dey, B., Dey, R. J., Cheung, L. S., Pokkali, S., Guo, H., Lee, J. H., & Bishai, W. R. (2015). A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis. *Nature Medicine*, 21(4), 401–408. <https://doi.org/10.1038/nm.3813>
- Ehrt, S., & Schnappinger, D. (2009). Mycobacterial survival strategies in the phagosome: Defence against host stresses. In *Cellular Microbiology* (Vol. 11, Issue 8, pp. 1170–1178). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01335.x>

- Eisenreich, W., Heesemann, J., Rudel, T. & Goebel, W. (2013). Metabolic host responses to infection by intracellular bacterial pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* <https://doi.org/10.1259/bjfr/25165760>
- Ernst, J. D. (2018). Mechanisms of M. tuberculosis Immune Evasion as Challenges to TB Vaccine Design. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 24, Issue 1, pp. 34–42). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.004>
- Erra Díaz, F., Ochoa, V., Merlotti, A., Dantas, E., Mazzitelli, I., Gonzalez Polo, V., Sabatté, J., Amigorena, S., Segura, E., & Geffner, J. (2020). Extracellular Acidosis and mTOR Inhibition Drive the Differentiation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cell Reports*, 31(5). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107613>
- Everts, B., Amiel, E., Huang, S. C. C., Smith, A. M., Chang, C. H., Lam, W. Y., Redmann, V., Freitas, T. C., Blagih, J., Van Der Windt, G. J. W., Artyomov, M. N., Jones, R. G., Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2014). TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1- $IKK\epsilon$  supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nature Immunology*, 15(4), 323–332. <https://doi.org/10.1038/ni.2833>
- Everts, B., Amiel, E., Van Der Windt, G. J. W., Freitas, T. C., Chott, R., Yarasheski, K. E., Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2012). Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood*, 120(7), 1422–1431. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-419747>
- Everts, B., & Pearce, E. J. (2014). Metabolic control of dendritic cell activation and function: Recent advances and clinical implications. *Frontiers in Immunology*, 5(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00203>
- Faridgozar, M., & Nikoueinejad, H. (2017). New findings of Toll-like receptors involved in Mycobacterium tuberculosis infection. *Pathogens and Global Health*, 111(5), 256–264. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1351080>
- Fernie, A. R., Zhang, Y., & Sampathkumar, A. (2020). Cytoskeleton Architecture Regulates Glycolysis Coupling Cellular Metabolism to Mechanical Cues. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 45, Issue 8, pp. 637–638). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.04.003>
- Ferreira, G. B., Kleijwegt, F. S., Waelkens, E., Lage, K., Nikolic, T., Hansen, D. A., Workman, C. T., Roep, B. O., Overbergh, L., & Mathieu, C. (2012). Differential protein pathways in 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and dexamethasone modulated tolerogenic human dendritic cells. *Journal of Proteome Research*, 11(2), 941–971. <https://doi.org/10.1021/pr200724e>
- Ferreira, G. B., Van Etten, E., Lage, K., Hansen, D. A., Moreau, Y., Workman, C. T., Waer, M., Verstuyf, A., Waelkens, E., Overbergh, L., & Mathieu, C. (2009).

- Proteome analysis demonstrates profound alterations in human dendritic cell nature by TX527, an analogue of vitamin D. *Proteomics*, 9(14), 3752–3764. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800848>
- Feruglio, S. L., Trøseid, M., Damås, J. K., Kvale, D., & Dyrhol-Riise, A. M. (2013). Soluble Markers of the Toll-Like Receptor 4 Pathway Differentiate between Active and Latent Tuberculosis and Are Associated with Treatment Responses. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069896>
- Finlay, D. K., Rosenzweig, E., Sinclair, L. V., Carmen, F. C., Hukelmann, J. L., Rolf, J., Panteleyev, A. A., Okkenhaug, K., & Cantrell, D. A. (2012). PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 209(13), 2441–2453. <https://doi.org/10.1084/jem.20112607>
- Fischer, K., Scotet, E., Niemeyer, M., Koebernick, H., Zerrahn, J., Maillet, S., Hurwitz, R., Kursar, M., Bonneville, M., Kaufmann, S. H. E., & Schaible, U. E. (2004). *Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403787101](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403787101)
- Flores, L. L., Steingart, K. R., Dendukuri, N., Schiller, I., Minion, J., Pai, M., Ramsay, A., Henry, M., & Laal, S. (2011). Systematic review and meta-analysis of antigen detection tests for the diagnosis of tuberculosis. In *Clinical and Vaccine Immunology* (Vol. 18, Issue 10, pp. 1616–1627). <https://doi.org/10.1128/CVI.05205-11>
- Forsythe, J. A., Jiang, B.-H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., & Semenza, G. L. (1996). Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 16, Issue 9). <http://mcb.asm.org/>
- Freemerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., Macintyre, A. N., Goraksha-Hicks, P., Rathmell, J. C., & Makowski, L. (2014). Metabolic reprogramming of macrophages: Glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 289(11), 7884–7896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522037>
- Gallucci, G., Santucci, N., Díaz, A., Bongiovanni, B., Bértola, D., Gardeñez, W., Rassetto, M., Bay, M. L., Bottasso, O., & D’Attilio, L. (2021). Increased levels of circulating LPS during Tuberculosis prevails in patients with advanced pulmonary involvement. *PLoS ONE*, 16(9 September). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257214>
- Gao, W., Xiong, Y., Li, Q., & Yang, H. (2017). Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: A journey from

- molecular to nano therapeutics. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 8, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00508>
- Gatti, A., Ceriani, C., De Paschale, M., Magnani, C., Villa, M., Vigano, P., Clerici, P., & Brando, B. (2020). Quantification of neutrophil and monocyte CD64 expression: A predictive biomarker for active tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 24(2), 196–201. <https://doi.org/10.5588/ijtld.19.0147>
- Geijtenbeek, T. B. H., Van Vliet, S. J., Koppel, E. A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Appelmelk, B., & Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *Journal of Experimental Medicine*, 197(1), 7–17. <https://doi.org/10.1084/jem.20021229>
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 6, pp. 392–404). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Gogolak, P., Rethi, B., Szatmari, I., Lanyi, A., Dezso, B., Nagy, L., & Rajnavolgyi, E. (2007). Differentiation of CD1a and CD1a monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04>
- Grant, N. L., Maiello, P., Klein, E., Lin, P. L., Borish, H. J., Tomko, J., Frye, L. J., White, A. G., Kirschner, D. E., Mattila, J. T., & Flynn, J. A. L. (2022). T cell transcription factor expression evolves over time in granulomas from Mycobacterium tuberculosis-infected cynomolgus macaques. *Cell Reports*, 39(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110826>
- Griffiths, K. L., Ahmed, M., Das, S., Gopal, R., Horne, W., Connell, T. D., Moynihan, K. D., Kolls, J. K., Irvine, D. J., Artyomov, M. N., Rangel-Moreno, J., & Khader, S. A. (2016). Targeting dendritic cells to accelerate T-cell activation overcomes a bottleneck in tuberculosis vaccine efficacy. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13894>
- Guak, H., Al Habyan, S., Ma, E. H., Aldossary, H., Al-Masri, M., Won, S. Y., Ying, T., Fixman, E. D., Jones, R. G., McCaffrey, L. M., & Krawczyk, C. M. (2018). Glycolytic metabolism is essential for CCR7 oligomerization and dendritic cell migration. *Nature Communications*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04804-6>
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., Segura, E., Tussiwand, R., & Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. In *Nature*

- Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 8, pp. 571–578). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3712>
- Hackett, E. E., Charles-Messance, H., O’Leary, S. M., Gleeson, L. E., Muñoz-Wolf, N., Case, S., Wedderburn, A., Johnston, D. G. W., Williams, M. A., Smyth, A., Ouimet, M., Moore, K. J., Lavelle, E. C., Corr, S. C., Gordon, S. V., Keane, J., & Sheedy, F. J. (2020). Mycobacterium tuberculosis Limits Host Glycolysis and IL-1 $\beta$  by Restriction of PFK-M via MicroRNA-21. *Cell Reports*, 30(1), 124–136.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.015>
- Harding, J. S., Rayasam, A., Schreiber, H. A., Fabry, Z., & Sandor, M. (2015). Mycobacterium-infected dendritic cells disseminate granulomatous inflammation. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep15248>
- Harelimana, J. D. D., Ahor, H. S., Benner, B., Hellmuth, S., Adankwah, E., Minadzi, D., Aniagyei, W., Lamptey, M. N. K., Arthur, J., Yeboah, A., Abass, M. K., Debrah, L. B., Owusu, D. O., Mayatepek, E., Seyfarth, J., Phillips, R. O., & Jacobsen, M. (2022). Cytokine-induced transient monocyte IL-7Ra expression and the serum milieu in tuberculosis. *European Journal of Immunology*, 52(6), 958–969. <https://doi.org/10.1002/eji.202149661>
- Hava, D. L., Van Der Wel, N., Cohen, N., Dascher, C. C., Houben, D., Leó, L., Agarwal, S., Sugita, M., Van Zon, M., Kent, S. C., Shams, H., Peters, P. J., & Brenner, M. B. (2008). *Evasion of peptide, but not lipid antigen presentation, through pathogen-induced dendritic cell maturation.* [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
- Heger, L., Balk, S., Lühr, J. J., Heidkamp, G. F., Lehmann, C. H. K., Hatscher, L., Purbojo, A., Hartmann, A., Garcia-Martin, F., Nishimura, S. I., Cesnjevar, R., Nimmerjahn, F., & Dudziak, D. (2018). CLEC10A Is a specific marker for human CD1c+ dendritic cells and enhances their toll-like receptor 7/8-Induced cytokine secretion. *Frontiers in Immunology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00744>
- Heimbeck, J. (1936). Tuberculosis in hospital nurses. *Tubercle*, 18(3), 97–99. [https://doi.org/10.1016/S0041-3879\(36\)80249-9](https://doi.org/10.1016/S0041-3879(36)80249-9)
- Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B. U., Goubau, D., & Reis e Sousa, C. (2015). GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*, 42(6), 1197–1211. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.018>
- Henrick, B. M., Yao, X. D., Taha, A. Y., Bruce German, J., & Rosenthal, K. L. (2016). Insights into soluble Toll-like receptor 2 as a downregulator of virally

- induced inflammation. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 7, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00291>
- Hillman, H., Khan, N., Singhanian, A., Dubelko, P., Soldevila, F., Tippalagama, R., DeSilva, A. D., Gunasena, B., Perera, J., Scriba, T. J., Ontong, C., Fisher, M., Luabeya, A., Taplitz, R., Seumois, G., Vijayanand, P., Hedrick, C. C., Peters, B., & Burel, J. G. (2023). Single-cell profiling reveals distinct subsets of CD14+ monocytes drive blood immune signatures of active tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1087010>
- Iberg, C. A., Jones, A., & Hawiger, D. (2017). Dendritic Cells As Inducers of Peripheral Tolerance. In *Trends in Immunology* (Vol. 38, Issue 11, pp. 793–804). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.007>
- Jantsch, J., Chakravorty, D., Turza, N., Prechtel, A. T., Buchholz, B., Gerlach, R. G., Volke, M., Gläsner, J., Warnecke, C., Wiesener, M. S., Eckardt, K.-U., Steinkasserer, A., Hensel, M., & Willam, C. (2008). Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 Modulate Lipopolysaccharide-Induced Dendritic Cell Activation and Function 1. In *The Journal of Immunology* (Vol. 180). [www.jimmunol.org](http://www.jimmunol.org)
- Jasmer, R. M., Hahn, J. A., Small, P. M., Daley, C. L., Behr, M. A., Moss, A. R., Creasman, J. M., Schechter, G. F., Paz, E. A., & Hopewell, P. C. (1999). A molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco, 1991-1997. *Annals of Internal Medicine*, 130(12), 971–978. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-130-12-199906150-00004>
- Jensen, C., Holm, L. L., Svensson, E., Aagaard, C., & Ruhwald, M. (2017). Optimisation of a murine splenocyte mycobacterial growth inhibition assay using virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02116-1>
- Jo, E. K., Yang, C. S., Choi, C. H., & Harding, C. V. (2007). Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to *Mycobacteria*: Branching out from Toll-like receptors. In *Cellular Microbiology* (Vol. 9, Issue 5, pp. 1087–1098). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00914.x>
- Juffermans, N. P., Verbon, A., Van Deventer, S. J. H., Buurman, W. A., Van Deutekom, H., Speelman, P., & Van Der Poll, T. (n.d.). *Serum Concentrations of Lipopolysaccharide Activity-Modulating Proteins during Tuberculosis*. <http://jid.oxfordjournals.org/>
- Kelly, B., & O'Neill, L. A. J. (2015). Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Research*, 25(7), 771–784. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.68>

- Kendall, E. A., Shrestha, S., & Dowdy, D. W. (2021). The epidemiological importance of subclinical tuberculosis a critical reappraisal. In *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (Vol. 203, Issue 2, pp. 168–174). American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1164/rccm.202006-2394PP>
- Khader, S. A., Partida-Sanchez, S., Bell, G., Jelley-Gibbs, D. M., Swain, S., Pearl, J. E., Ghilardi, N., DeSavauge, F. J., Lund, F. E., & Cooper, A. M. (2006). Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1805–1815. <https://doi.org/10.1084/jem.20052545>
- Khusro, A., Aarti, C., & Agastian, P. (2016). Anti-tubercular peptides: A quest of future therapeutic weapon to combat tuberculosis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(11), 1023–1034. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.09.005>
- Kido, K., Yamanaka, S., Nakano, S., Motani, K., Shinohara, S., Nozawa, A., Kosako, H., Ito, S., & Sawasaki, T. (2020). Airid, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein–protein interactions. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.54983>
- Kishore, M., Cheung, K. C. P., Fu, H., Bonacina, F., Wang, G., Coe, D., Ward, E. J., Colamatteo, A., Jangani, M., Baragetti, A., Matarese, G., Smith, D. M., Haas, R., Mauro, C., Wraith, D. C., Okkenhaug, K., Catapano, A. L., De Rosa, V., Norata, G. D., & Marelli-Berg, F. M. (2017). Regulatory T Cell Migration Is Dependent on Glucokinase-Mediated Glycolysis. *Immunity*, 47(5), 875–889.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.017>
- Koh, M. Y., Spivak-Kroizman, T., Venturini, S., Welsh, S., Williams, R. R., Kirkpatrick, D. L., & Powis, G. (2008). Molecular mechanisms for the activity of PX-478, an antitumor inhibitor of the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(1), 90–100. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0463>
- Kong, D., Park, E. J., Stephen, A. G., Calvani, M., Cardellina, J. H., Monks, A., Fisher, R. J., Shoemaker, R. H., & Melillo, G. (2005). Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Research*, 65(19), 9047–9055. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1235>
- Krawczyk, C. M., Holowka, T., Sun, J., Blagih, J., Amiel, E., DeBerardinis, R. J., Cross, J. R., Jung, E., Thompson, C. B., Jones, R. G., & Pearce, E. J. (2010a). Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*, 115(23), 4742–4749. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-249540>

- Krawczyk, C. M., Holowka, T., Sun, J., Blagih, J., Amiel, E., DeBerardinis, R. J., Cross, J. R., Jung, E., Thompson, C. B., Jones, R. G., & Pearce, E. J. (2010b). Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*, *115*(23), 4742–4749. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-249540>
- Kumar, P. (2017). IFN $\gamma$ -producing CD4 + T lymphocytes: the double-edged swords in tuberculosis . *Clinical and Translational Medicine*, *6*(1). <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0151-8>
- Lachmandas, E., Boutens, L., Ratter, J. M., Hijmans, A., Hooiveld, G. J., Joosten, L. A. B., Rodenburg, R. J., Franssen, J. A. M., Houtkooper, R. H., Van Crevel, R., Netea, M. G., & Stienstra, R. (2016). Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes. *Nature Microbiology*, *2*. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.246>
- Lai, R., Jeyanathan, M., Afkhami, S., Zganiacz, A., Hammill, J. A., Yao, Y., Kaushic, C., & Xing, Z. (2018). CD11b+ Dendritic Cell-Mediated Anti- Mycobacterium tuberculosis Th1 Activation Is Counterregulated by CD103+ Dendritic Cells via IL-10 . *The Journal of Immunology*, *200*(5), 1746–1760. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701109>
- Langley, R. J., Tsalik, E. L., Van Velkinburgh, J. C., Glickman, S. W., Rice, B. J., Wang, C., Chen, B., Carin, L., Suarez, A., Mohny, R. P., Freeman, D. H., Wang, M., You, J., Wulff, J., Thompson, J. W., Moseley, M. A., Reisinger, S., Edmonds, B. T., Grinnell, B., ... Kingsmore, S. F. (n.d.). *An Integrated Clinico-Metabolomic Model Improves Prediction of Death in Sepsis*. [www.ScienceTranslationalMedicine.org](http://www.ScienceTranslationalMedicine.org)
- Lastrucci, C., Bénard, A., Balboa, L., Pingris, K., Souriant, S., Poincloux, R., Al Saati, T., Rasolofo, V., González-Montaner, P., Inwentarz, S., Moraña, E. J., Kondova, I., Verreck, F. A. W., Del Carmen Sasiain, M., Neyrolles, O., Maridonneau-Parini, I., Lugo-Villarino, G., & Cougoule, C. (2015). Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16+ monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell Research*, *25*(12), 1333–1351. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.123>
- Lawless, S. J., Kedia-Mehta, N., Walls, J. F., McGarrigle, R., Convery, O., Sinclair, L. V., Navarro, M. N., Murray, J., & Finlay, D. K. (2017). Glucose represses dendritic cell-induced T cell responses. *Nature Communications*, *8*(May), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms15620>
- Layre, E., Collmann, A., Bastian, M., Mariotti, S., Czaplicki, J., Prandi, J., Mori, L., Stenger, S., De Libero, G., Puzo, G., & Gilleron, M. (2009). Mycolic Acids Constitute a Scaffold for Mycobacterial Lipid Antigens Stimulating CD1-

- Restricted T Cells. *Chemistry and Biology*, 16(1), 82–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.11.008>
- Libero, G. De, & Mori, L. (2014). The T-cell response to lipid antigens of Mycobacterium tuberculosis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue MAY, pp. 1–1). Frontiers Research Foundation.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00219>
- Lin, P. L., & Flynn, J. L. (2010). Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *The Journal of Immunology*, 185(1), 15–22.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903856>
- Lin, Y., Zhang, M., & Barnes, P. F. (1998). Chemokine Production by a Human Alveolar Epithelial Cell Line in Response to Mycobacterium tuberculosis. Downloaded from. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 66, Issue 3). <http://iai.asm.org/>
- Liu, C., Zhao, Z., Fan, J., Lyon, C. J., Wu, H. J., Nedelkov, D., Zelazny, A. M., Olivier, K. N., Cazares, L. H., Holland, S. M., Graviss, E. A., & Hu, Y. (2017). Quantification of circulating Mycobacterium tuberculosis antigen peptides allows rapid diagnosis of active disease and treatment monitoring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(15), 3969–3974. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621360114>
- Liu, Y., Wan, X., & Wang, B. (2019). Engineered CRISPRa enables programmable eukaryote-like gene activation in bacteria. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11479-0>
- Loon Wong, K., Jing-Yi Tai, J., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., & Wong, S.-C. (2011). *Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets New official nomenclature subdivides human monocytes into 3 subsets: the classical (CD14 CD16 ), intermediate (CD14 CD16 ), and nonclassical (CD14 CD16 ) monocytes.* <https://doi.org/10.1182/blood-2010>
- Lugo-Villarino, G., & Neyrolles, O. (2013). Dressed not to kill: CD16+ monocytes impair immune defence against tuberculosis. In *European Journal of Immunology* (Vol. 43, Issue 2, pp. 327–330). <https://doi.org/10.1002/eji.201243256>
- Luo, J., Tian, Z., Song, F., Ren, C., & Liu, W. (2024). Dual-specificity phosphatase 5-mediated fatty acid oxidation promotes Mycobacterium bovis BCG - induced inflammatory responses. *Experimental Cell Research*, 434(2). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113869>

- Luo, Y., Suliman, S., Asgari, S., Amariuta, T., Baglaenko, Y., Martínez-Bonet, M., Ishigaki, K., Gutierrez-Arcelus, M., Calderon, R., Lecca, L., León, S. R., Jimenez, J., Yataco, R., Contreras, C., Galea, J. T., Becerra, M., Nejentsev, S., Nigrovic, P. A., Moody, D. B., ... Raychaudhuri, S. (2019). Early progression to active tuberculosis is a highly heritable trait driven by 3q23 in Peruvians. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11664-1>
- Madan-Lala, R., Peixoto, K. V., Re, F., & Rengarajan, J. (2011). Mycobacterium tuberculosis hip1 dampens macrophage proinflammatory responses by limiting toll-like receptor 2 activation. *Infection and Immunity*, *79*(12), 4828–4838. <https://doi.org/10.1128/IAI.05574-11>
- Madan-Lala, R., Sia, J. K., King, R., Adekambi, T., Monin, L., Khader, S. A., Pulendran, B., & Rengarajan, J. (2014). Mycobacterium tuberculosis Impairs Dendritic Cell Functions through the Serine Hydrolase Hip1 . *The Journal of Immunology*, *192*(9), 4263–4272. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303185>
- Magallanes-Puebla, A., Espinosa-Cueto, P., López-Marín, L. M., & Mancilla, R. (2018). Mycobacterial glycolipid Di-O-acyl trehalose promotes a tolerogenic profile in dendritic cells. *PLoS ONE*, *13*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207202>
- Maio, M., Barros, J., Joly, M., Vahlas, Z., Marín Franco, J. L., Genoula, M., Monard, S. C., Vecchione, M. B., Fuentes, F., Polo, V. G., Quiroga, M. F., Vermeulen, M., Vu Manh, T. P., Argüello, R. J., Inwentarz, S., Musella, R., Ciallella, L., Montaner, P. G., Palmero, D., ... Balboa, L. (2023). Elevated glycolytic metabolism of monocytes limits the generation of HIF1A-driven migratory dendritic cells in tuberculosis. *ELife*, *12*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.89319>
- Manoharan, I., Prasad, P. D., Thangaraju, M., & Manicassamy, S. (2021). Lactate-Dependent Regulation of Immune Responses by Dendritic Cells and Macrophages. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691134>
- Manzanillo, P. S., Shiloh, M. U., Portnoy, D. A., & Cox, J. S. (2012). Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host and Microbe*, *11*(5), 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.03.007>
- Marín Franco, J. L., Genoula, M., Corral, D., Duette, G., Ferreyra, M., Maio, M., Dolotowicz, M. B., Aparicio-Trejo, O. E., Patiño-Martínez, E., Charton, A., Métails, A., Fuentes, F., Soldan, V., Moraña, E. J., Palmero, D., Ostrowski, M., Schierloh, P., Sánchez-Torres, C., Hernández-Pando, R., ... Balboa, L. (2020). Host-Derived Lipids from Tuberculous Pleurisy Impair Macrophage

- Microbicidal-Associated Metabolic Activity. *Cell Reports*, 33(13).  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108547>
- Márquez, S., Fernández, J. J., Terán-Cabanillas, E., Herrero, C., Alonso, S., Azogil, A., Montero, O., Iwawaki, T., Cubillos-Ruiz, J. R., Fernández, N., & Crespo, M. S. (2017). Endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 $\alpha$  enhances IL-23 expression by human dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 8(JUN).  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00639>
- Martín-Fontecha, A., Sebastiani, S., Höpken, U. E., Ugucioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: Impact on T lymphocyte traffic and priming. *Journal of Experimental Medicine*, 198(4), 615–621.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20030448>
- Mathis, D., & Shoelson, S. E. (2011). Immunometabolism: An emerging frontier. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 81–83. <https://doi.org/10.1038/nri2922>
- McGettrick, A. F., & O'Neill, L. A. J. (2020). The Role of HIF in Immunity and Inflammation. In *Cell Metabolism* (Vol. 32, Issue 4, pp. 524–536). Cell Press.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.002>
- McNamee, D., Rangel, A., & O'Doherty, J. P. (2013). Category-dependent and category-independent goal-value codes in human ventromedial prefrontal cortex. *Nature Neuroscience*, 16(4), 479–485.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3337>
- Mildner, A., Schönheit, J., Giladi, A., David, E., Lara-Astiaso, D., Lorenzo-Vivas, E., Paul, F., Chappell-Maor, L., Priller, J., Leutz, A., Amit, I., & Jung, S. (2017). Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP $\beta$  Transcription Factor Dependence of Ly6C<sup>+</sup> Cells. *Immunity*, 46(5), 849–862.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.018>
- Molecular Interaction of CD1b with Lipoglycan Antigens.* (n.d.).
- Møller, S. H., Wang, L., & Ho, P. C. (2022). Metabolic programming in dendritic cells tailors immune responses and homeostasis. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 370–383). Springer Nature.  
<https://doi.org/10.1038/s41423-021-00753-1>
- Mootoo, A., Stylianou, E., Arias, M. A., & Reljic, R. (2009). TNF-in Tuberculosis: A Cytokine with a Split Personality. In *Inflammation & Allergy-Drug Targets* (Vol. 8).
- Morita, M., Gravel, S. P., Hulea, L., Larsson, O., Pollak, M., St-Pierre, J., & Topisirovic, I. (2015). mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity. In *Cell*

- Cycle* (Vol. 14, Issue 4, pp. 473–480). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.991572>
- Movafagh, S., Crook, S., & Vo, K. (2015). Regulation of hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  by reactive oxygen species: New developments in an old debate. In *Journal of Cellular Biochemistry* (Vol. 116, Issue 5, pp. 696–703). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcb.25074>
- Naffin-Olivos, J. L., Georgieva, M., Goldfarb, N., Madan-Lala, R., Dong, L., Bizzell, E., Valinetz, E., Brandt, G. S., Yu, S., Shabashvili, D. E., Ringe, D., Dunn, B. M., Petsko, G. A., & Rengarajan, J. (2014). Mycobacterium tuberculosis Hip1 Modulates Macrophage Responses through Proteolysis of GroEL2. *PLoS Pathogens*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004132>
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2006). Fc $\gamma$  receptors: Old friends and new family members. In *Immunity* (Vol. 24, Issue 1, pp. 19–28). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.010>
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2008). Fc $\gamma$  receptors as regulators of immune responses. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 34–47). <https://doi.org/10.1038/nri2206>
- Nouailles, G., Dorhoi, A., Koch, M., Zerrahn, J., Weiner, J., Faé, K. C., Arrey, F., Kuhlmann, S., Bandermann, S., Loewe, D., Mollenkopf, H. J., Vogelzang, A., Meyer-Schwesinger, C., Mittrücker, H. W., McEwen, G., & Kaufmann, S. H. E. (2014). CXCL5-secreting pulmonary epithelial cells drive destructive neutrophilic inflammation in tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 1268–1282. <https://doi.org/10.1172/JCI72030>
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Rg Zwirner, J., Blankenstein, T., & Henning, G. (2004). CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions naive T cells as well as other DC through the interaction with CCR7 (Luther et al., 2000; Sallusto et al., 1998). In contrast to the widely accepted model for lymphocyte. In *Immunity* (Vol. 21).
- Olmos, S., Stukes, S., & Ernst, J. D. (2010). Ectopic Activation of Mycobacterium tuberculosis -Specific CD4+ T Cells in Lungs of CCR7-/- Mice . *The Journal of Immunology*, 184(2), 895–901. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901230>
- O'Neill, L. A. J., & Pearce, E. J. (2016). Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. In *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 213, Issue 1, pp. 15–23). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20151570>

- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 2). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Park, J. S., Burckhardt, C. J., Lazcano, R., Solis, L. M., Isogai, T., Li, L., Chen, C. S., Gao, B., Minna, J. D., Bachoo, R., DeBerardinis, R. J., & Danuser, G. (2020). Mechanical regulation of glycolysis via cytoskeleton architecture. *Nature*, *578*(7796), 621–626. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1998-1>
- Parlato, S., Chiacchio, T., Salerno, D., Petrone, L., Castiello, L., Romagnoli, G., Canini, I., Goletti, D., & Gabriele, L. (2018). Impaired IFN- $\alpha$ -mediated signal in dendritic cells differentiates active from latent tuberculosis. *PLoS ONE*, *13*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189477>
- Patel, A. A., Zhang, Y., Fullerton, J. N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A. A., Bigley, V., Flavell, R. A., Gilroy, D. W., Asquith, B., Macallan, D., & Yona, S. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(7), 1913–1923. <https://doi.org/10.1084/jem.20170355>
- Patel, V. I., Booth, J. L., Duggan, E. S., Cate, S., White, V. L., Hutchings, D., Kovats, S., Burian, D. M., Dozmorov, M., & Metcalf, J. P. (2017). Transcriptional Classification and Functional Characterization of Human Airway Macrophage and Dendritic Cell Subsets. *The Journal of Immunology*, *198*(3), 1183–1201. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600777>
- Pearce, E. J., & Everts, B. (2015). Dendritic cell metabolism. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 15, Issue 1, pp. 18–29). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3771>
- Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, *38*(4), 633–643. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>
- Pence, B. D., & Yarbro, J. R. (2019). Classical monocytes maintain ex vivo glycolytic metabolism and early but not later inflammatory responses in older adults. *Immunity and Ageing*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12979-019-0143-1>
- Philips, J. A., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis pathogenesis and immunity. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (Vol. 7, pp. 353–384). <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132458>
- Plumlee, C. R., Duffy, F. J., Gern, B. H., Delahaye, J. L., Cohen, S. B., Stoltzfus, C. R., Rustad, T. R., Hansen, S. G., Axthelm, M. K., Picker, L. J., Aitchison, J. D., Sherman, D. R., Ganusov, V. V., Gerner, M. Y., Zak, D. E., & Urdahl, K. B. (2020).

- Ultra-low Dose Aerosol Infection of Mice with *Mycobacterium tuberculosis* More Closely Models Human Tuberculosis. *Cell Host and Microbe*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.10.003>
- Quesniaux, V., Fremont, C., Jacobs, M., Parida, S., Nicolle, D., Yeremeev, V., Bihl, F., Erard, F., Botha, T., Drennan, M., Soler, M. N., Le Bert, M., Schnyder, B., & Ryffel, B. (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. In *Microbes and Infection* (Vol. 6, Issue 10, pp. 946–959). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.04.016>
- Rajashree, P., Supriya, P., & Das, S. D. (2008). Differential migration of human monocyte-derived dendritic cells after infection with prevalent clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology*, 213(7), 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.01.007>
- Reed, M. B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A. K., Kreiswirth, B. N., & Kaplan, G. (2004). A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. In *Nature* (Vol. 431, Issue 7004, pp. 84–87). <https://doi.org/10.1038/nature02837>
- Rehman, A., Hemmert, K. C., Ochi, A., Jamal, M., Henning, J. R., Barilla, R., Quesada, J. P., Zambirinis, C. P., Tang, K., Ego-Osuala, M., Rao, R. S., Greco, S., Deutsch, M., Narayan, S., Pachter, H. L., Graffeo, C. S., Acehan, D., & Miller, G. (2013). Role of Fatty-Acid Synthesis in Dendritic Cell Generation and Function. *The Journal of Immunology*, 190(9), 4640–4649. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202312>
- Reiley, W. W., Calayag, M. D., Wittmer, S. T., Huntington, J. L., Pearl, J. E., Fountain, J. J., Martino, C. A., Roberts, A. D., Cooper, A. M., Winslow, G. M., Woodland, D. L., & McSorley, S. (2008). *ESAT-6-specific CD4 T cell responses to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection are initiated in the mediastinal lymph nodes*. [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
- Rengarajan, J., Murphy, E., Park, A., Krone, C. L., Hett, E. C., Bloom, B. R., Glimcher, L. H., & Rubin, E. J. (2008). *Mycobacterium tuberculosis Rv2224c modulates innate immune responses*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0710601105](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0710601105)
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G., & Karin, M. (2008a). NF- $\kappa$ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nature*, 453(7196), 807–811. <https://doi.org/10.1038/nature06905>
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G., & Karin, M. (2008b). NF- $\kappa$ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nature*, 453(7196), 807–811. <https://doi.org/10.1038/nature06905>

- Roberts, L. L., & Robinson, C. M. (2014). Mycobacterium tuberculosis infection of human dendritic cells decreases integrin expression, adhesion and migration to chemokines. *Immunology*, *141*(1), 39–51. <https://doi.org/10.1111/imm.12164>
- Romagnoli, A., Etna, M. P., Giacomini, E., Pardini, M., Remoli, M. E., Corazzari, M., Falasca, L., Goletti, D., Gafa, V., Simeone, R., Delogu, G., Piacentini, M., Brosch, R., Fimia, G. M., & Coccia, E. M. (2012). ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells. *Autophagy*, *8*(9), 1357–1370. <https://doi.org/10.4161/auto.20881>
- Ruiz-Sánchez, B. P., Francisco-Cruz, A., Miguel-Hernández, S., Castañeda-Casimiro, J., Hernández-Solís, A., Cicero-Sabido, R., Chacón-Salinas, R., Serafín-López, J., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payán, J., Hernández-Pando, R., Estrada-Parra, S., Wong-Baeza, I., & Estrada-García, I. (2020). Circulating antigens in mice infected with Mycobacterium tuberculosis and in patients with tuberculosis. *Revista Médica Del Hospital General de México*, *83*(3). <https://doi.org/10.24875/hgmx.19000045>
- Ryan, D. G., & O'Neill, L. A. J. (2017). Krebs cycle rewired for macrophage and dendritic cell effector functions. In *FEBS Letters* (Vol. 591, Issue 19, pp. 2992–3006). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12744>
- Ryan, R. C., O, M. P., & Keane, J. (2011). *Mycobacterium tuberculosis infection induces non-apoptotic cell death of human dendritic cells*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/237>
- Sahasrabudhe, N. M., Van Der Horst, J. C., Spaans, V., Kenter, G., De Kroon, C., Bosse, T., Van Vliet, S. J., & Jordanova, E. S. (2019). MGL ligand expression is correlated to lower survival and distant metastasis in cervical squamous cell and adenosquamous carcinoma. *Frontiers in Oncology*, *9*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00029>
- Sakhno, L. V., Shevela, E. Y., Tikhonova, M. A., Nikonov, S. D., Ostanin, A. A., & Chernykh, E. R. (2015). Impairments of Antigen-Presenting Cells in Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Immunology Research*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/793292>
- Samstein, M., Schreiber, H. A., Leiner, I. M., Sušac, B., Glickman, M. S., & Pamer, E. G. (2013). Essential yet limited role for CCR2+ inflammatory monocytes during Mycobacterium tuberculosis-specific T cell priming. *eLife*, *2013*(2). <https://doi.org/10.7554/eLife.01086>
- Sánchez, M. D., García, Y., Montes, C., París, S. C., Rojas, M., Barrera, L. F., Arias, M. A., & García, L. F. (2006). Functional and phenotypic changes in monocytes

- from patients with tuberculosis are reversed with treatment. *Microbes and Infection*, 8(9–10), 2492–2500. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.06.005>
- Schaible, U. E., Hagens, K., Fischer, K., Collins, H. L., & Kaufmann, S. H. E. (2000). Intersection of Group I CD1 Molecules and Mycobacteria in Different Intracellular Compartments of Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 164(9), 4843–4852. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4843>
- Schaible, U. E., Weiss, unter, & Weiss, G. (2015). *G€ unter Weiss Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria*. [www.immunologicalreviews.com](http://www.immunologicalreviews.com)
- Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M. I., Liu, Y., Mangan, J. A., Monahan, I. M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P. D., Nathan, C., & Schoolnik, G. K. (2003). Transcriptional adaptation of Mycobacterium tuberculosis within macrophages: Insights into the phagosomal environment. *Journal of Experimental Medicine*, 198(5), 693–704. <https://doi.org/10.1084/jem.20030846>
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., & Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17406–17409. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17406>
- Semba, H., Takeda, N., Isagawa, T., Sugiura, Y., Honda, K., Wake, M., Miyazawa, H., Yamaguchi, Y., Miura, M., Jenkins, D. M. R., Choi, H., Kim, J. W., Asagiri, M., Cowburn, A. S., Abe, H., Soma, K., Koyama, K., Katoh, M., Sayama, K., ... Komuro, I. (2016). HIF-1 $\alpha$ -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11635>
- Semenza, G. L. (2011). Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. In *N Engl J Med* (Vol. 365).
- Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annual Review of Physiology*, 76, 39–56. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170322>
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordat, J. P., Maire, P., & Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51), 32529–32537. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32529>
- Sia, J. K., & Rengarajan, J. (2019). Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections. *Microbiology Spectrum*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0022-2018>

- Sieling, P. A., Chatterjee, D., Porcelli, S. A., Prigozy, T. I., Mazzaccaro, R. J., Soriano, T., Bloom, B. R., Brenner, M. B., Kronenberg, M., Brennan, P. J., & Modlin, R. L. (n.d.). *SlpUN CDI-Restricted T Cell Recognition of Microbial Lipoglycan Antigens*.
- Sim, W. J., Ahl, P. J., & Connolly, J. E. (2016). Metabolism Is Central to Tolerogenic Dendritic Cell Function. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2636701>
- Sinsimer, D., Huet, G., Manca, C., Tsenova, L., Koo, M. S., Kurepina, N., Kana, B., Mathema, B., Marras, S. A. E., Kreiswirth, B. N., Guilhot, C., & Kaplan, G. (2008). The phenolic glycolipid of Mycobacterium tuberculosis differentially modulates the early host cytokine response but does not in itself confer hypervirulence. *Infection and Immunity*, 76(7), 3027–3036. <https://doi.org/10.1128/IAI.01663-07>
- Smith, S. G., Zelmer, A., Blitz, R., Fletcher, H. A., & Dockrell, H. M. (2016). Polyfunctional CD4 T-cells correlate with in vitro mycobacterial growth inhibition following Mycobacterium bovis BCG-vaccination of infants. *Vaccine*, 34(44), 5298–5305. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.002>
- Snyder, J. P., & Amiel, E. (2019). Regulation of dendritic cell immune function and metabolism by cellular nutrient sensor mammalian target of rapamycin (mTOR). In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03145>
- Spinelli, L., Carpentier, S., Montañana Sanchis, F., Dalod, M., & Vu Manh, T. P. (2015). BubbleGUM: Automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive visualization of multiple Gene Set Enrichment Analyses. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2012-4>
- Srivastava, S., Grace, P. S., & Ernst, J. D. (2016). Antigen Export Reduces Antigen Presentation and Limits T Cell Control of M. tuberculosis. *Cell Host and Microbe*, 19(1), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.003>
- Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melián, A., Bogdan, C., Porcelli, S. A., Bloom, B. R., Krensky, A. M., & Modlin, R. L. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, 282(5386), 121–125. <https://doi.org/10.1126/science.282.5386.121>
- Stüve, P., Minarrieta, L., Erdmann, H., Arnold-Schrauf, C., Swallow, M., Guderian, M., Krull, F., Hölscher, A., Ghorbani, P., Behrends, J., Abraham, W. R., Hölscher, C., Sparwasser, T. D., & Berod, L. (2018). De novo fatty acid synthesis during mycobacterial infection is a prerequisite for the function of highly

- proliferative T cells, but not for dendritic cells or macrophages. *Frontiers in Immunology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00495>
- Szatmari, I., Gogolak, P., Im, J. S., Dezso, B., Rajnavolgyi, E., & Nagy, L. (2004). Activation of PPAR Specifies a Dendritic Cell Subtype Capable of Enhanced Induction of iNKT Cell Expansion. In *Immunity* (Vol. 21).
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R. S., Hirao, A., Suematsu, M., & Suda, T. (2010). Regulation of the HIF-1 $\alpha$  level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 7(3), 391–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.020>
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-Mcdermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., ... O'Neill, L. A. J. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature*, 496(7444), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11986>
- Torrelles, J. B., Sieling, P. A., Zhang, N., Keen, M. A., McNeil, M. R., Belisle, J. T., Modlin, R. L., Brennan, P. J., & Chatterjee, D. (2012). Isolation of a distinct Mycobacterium tuberculosis mannose-capped lipoarabinomannan isoform responsible for recognition by CD1b-restricted T cells. *Glycobiology*, 22(8), 1118–1127. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws078>
- Triglia, D., Gogan, K. M., Keane, J., & O'Sullivan, M. P. (2023). Glucose metabolism and its role in the maturation and migration of human CD1c+ dendritic cells following exposure to BCG. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1113744>
- Tripathi, D., Devalraju, K. P., Neela, V. S. K., Mukherjee, T., Paidipally, P., Radhakrishnan, R. K., Dozmorov, I., Vankayalapati, A., Ansari, M. S., Mallidi, V., Bogam, A. K., Singh, K. P., Samten, B., Valluri, V. L., & Vankayalapati, R. (2022a). Metabolites enhance innate resistance to human Mycobacterium tuberculosis infection. *JCI Insight*, 7(22). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.152357>
- Tripathi, D., Devalraju, K. P., Neela, V. S. K., Mukherjee, T., Paidipally, P., Radhakrishnan, R. K., Dozmorov, I., Vankayalapati, A., Ansari, M. S., Mallidi, V., Bogam, A. K., Singh, K. P., Samten, B., Valluri, V. L., & Vankayalapati, R. (2022b). Metabolites enhance innate resistance to human Mycobacterium tuberculosis infection. *JCI Insight*, 7(22). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.152357>

- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D., & Aderem, A. (1999). *Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages*. [www.pnas.org](http://www.pnas.org)
- Van Crevel, R., Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A. B., & Netea, M. G. (2011). Innate immune recognition of mycobacterium tuberculosis. In *Clinical and Developmental Immunology* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/405310>
- van Vliet, S. J., Paessens, L. C., Broks-van den Berg, V. C. M., Geijtenbeek, T. B. H., & van Kooyk, Y. (2008). The C-Type Lectin Macrophage Galactose-Type Lectin Impedes Migration of Immature APCs. *The Journal of Immunology*, *181*(5), 3148–3155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3148>
- Verver, S., Warren, R. M., Munch, Z., Vynnycky, E., van Helden, P. D., Richardson, M., van der Spuy, G. D., Enarson, D. A., Borgdorff, M. W., Behr, M. A., & Beyers, N. (2004). Transmission of tuberculosis in a high incidence urban community in South Africa. *International Journal of Epidemiology*, *33*(2), 351–357. <https://doi.org/10.1093/ije/dyh021>
- Villani, A. C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., Jardine, L., Dixon, D., Stephenson, E., Nilsson, E., Grundberg, I., McDonald, D., Filby, A., Li, W., De Jager, P. L., ... Hacohen, N. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*, *356*(6335). <https://doi.org/10.1126/science.aah4573>
- Wacleche, V. S., Tremblay, C. L., Routy, J. P., & Ancuta, P. (2018). The biology of monocytes and dendritic cells: Contribution to HIV pathogenesis. In *Viruses* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v10020065>
- Wallgren, A. (n.d.). *The Time-Table of Tuberculosis*.
- Wang, G. L., Jiang, B.-H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension (dioxin receptor/erythropoietin/hypoxia/transcription). In *Genetics* (Vol. 92).
- Wang, X., Barnes, P. F., Huang, F., Alvarez, I. B., Neuenschwander, P. F., Sherman, D. R., & Samten, B. (2012). Early Secreted Antigenic Target of 6-kDa Protein of Mycobacterium tuberculosis Primes Dendritic Cells To Stimulate Th17 and Inhibit Th1 Immune Responses . *The Journal of Immunology*, *189*(6), 3092–3103. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200573>
- Watson, R. O., Bell, S. L., MacDuff, D. A., Kimmey, J. M., Diner, E. J., Olivas, J., Vance, R. E., Stallings, C. L., Virgin, H. W., & Cox, J. S. (2015). The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I

- Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host and Microbe*, 17(6), 811–819. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.004>
- Watson, R. O., Manzanillo, P. S., & Cox, J. S. (2012). Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell*, 150(4), 803–815. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.040>
- Wculek, S. K., Khouili, S. C., Priego, E., Heras-Murillo, I., & Sancho, D. (2019). Metabolic Control of Dendritic Cell Functions: Digesting Information. In *Frontiers in immunology* (Vol. 10, p. 775). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00775>
- Weis, S. E., Pogoda, J. M., Yang, Z., Donald Cave, M., Wallace, C., Kelley, M., & Barnes, P. F. (2002). Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant County, Texas. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(1), 36–42. <https://doi.org/10.1164/rccm.2109089>
- WHO. (2024). *2024 Global tuberculosis report*.
- Wickremasinghe, M. I., Thomas, L. H., & Friedland, J. S. (1999). Pulmonary Epithelial Cells are a Source of IL-8 in the Response to Mycobacterium tuberculosis: Essential Role of IL-1 from Infected Monocytes in a NF-κB-Dependent Network. *The Journal of Immunology*, 163(7), 3936–3947. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.163.7.3936>
- Wolf, A. J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2008a). Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20071367>
- Wolf, A. J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2008b). Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20071367>
- Wolf, A. J., Linas, B., Trevejo-Nuñez, G. J., Kincaid, E., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2007). Mycobacterium tuberculosis Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function In Vivo. *The Journal of Immunology*, 179(4), 2509–2519. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2509>
- Wu, B., Huang, C., Kato-Maeda, M., Hopewell, P. C., Daley, C. L., Krensky, A. M., & Clayberger, C. (2008). IL-9 is associated with an impaired Th1 immune response in patients with tuberculosis. *Clinical Immunology*, 126(2), 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.09.009>

- Wu, T., Guo, S., Wang, J., Li, L., Xu, L., Liu, P., Ma, S., Zhang, J., Xu, L., & Luo, Y. (2011). Interaction between mannosylated lipoarabinomannan and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin influences dendritic cells maturation and T cell immunity. *Cellular Immunology*, 272(1), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.09.001>
- Yetkin-Arik, B., Vogels, I. M. C., Nowak-Sliwinska, P., Weiss, A., Houtkooper, R. H., Van Noorden, C. J. F., Klaassen, I., & Schlingemann, R. O. (2019). The role of glycolysis and mitochondrial respiration in the formation and functioning of endothelial tip cells during angiogenesis. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48676-2>
- Zaccagnino, P., Saltarella, M., Maiorano, S., Gaballo, A., Santoro, G., Nico, B., Lorusso, M., & Del Prete, A. (2012). An active mitochondrial biogenesis occurs during dendritic cell differentiation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(11), 1962–1969. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.07.024>
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J. M., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., & Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. In *Blood* (Vol. 116, Issue 16). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>
- Zulfiqar Malik, B. A., Denning, G. M., & Kusner, D. J. (2000). Inhibition of Ca<sup>2+</sup> Signaling by Mycobacterium tuberculosis Is Associated with Reduced Phagosome-Lysosome Fusion and Increased Survival within Human Macrophages. In *J. Exp. Med* (Vol. 191, Issue 2). <http://www.jem.org>