

**TÍTULO: POLIMORFISMOS EN DECTIN-1 Y LA INFECCIÓN TUBERCULOSA**

DIRECTOR: Alemán, Mercedes

CO-DIRECTOR: Duarte, Alejandra

FILIACIÓN DE LOS INVESTIGADORES COLABORADORES:

SEDE-LUGAR: Sede Larrea y Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), Academia Nacional de Medicina

FECHA: abril 2022

CONTACTO DEL DIRECTOR: [melealeman@hotmail.com](mailto:melealeman@hotmail.com)

I.	Índice	página
	Resumen y palabras clave	2
	Abstract and key words	3
	Introducción	4
	Metodología	6
	Resultados	10
	Conclusión y Discusión	14
	Bibliografía	17

## II. Resumen

Estudios genómicos demuestran que la genética del huésped influye fuertemente en la susceptibilidad a la enfermedad tuberculosa, por ejemplo polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes de varias moléculas que participan en la inmunidad contra el *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Un SNP en DECTIN-1 (Y238X, rs16910526) genera un codón stop temprano, dando lugar a la pérdida de los últimos 10 aminoácidos del receptor, afectando su expresión en membrana y unión a sus distintos ligandos. Este SNP está asociado clínicamente a micosis cutáneas recurrentes, sin embargo, no ha sido estudiada hasta hoy su asociación con la enfermedad tuberculosa ni se conoce su frecuencia genotípica en Sudamérica. Nuestro grupo de investigación demostró que *Mtb* induce la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS) en los neutrófilos y células dendríticas a través de la interacción con Dectin-1, lo que favorece la respuesta inmune contra la micobacteria. Así pues, nos propusimos estudiar si la presencia de la mutación incide sobre la enfermedad tuberculosa, la clínica del paciente, los parámetros celulares in vitro y además evaluamos la frecuencia genotípica en la población estudiada. Para ello se amplificó DECTIN-1 mediante PCR a partir de ADN complementario aislado de muestras de sangre de pacientes y dadores sanos, secuenciándose posteriormente para ver la presencia de la mutación; se analizó la expresión de Dectin-1 en la membrana del neutrófilo y el nivel de ROS intracelular (por la oxidación de DHR123 en respuesta al antígeno *Mtb* ( $1 \times 10^8$  bacilos/ml) evaluándose los resultados por citometría de flujo. Demostramos que los pacientes con TB tienen una menor expresión de Dectin-1 y producción de ROS comparado con los dadores sanos ( $p < 0.02$ ). El haplotipo heterocigota del SNP tiene una frecuencia genotípica de 33% en la población en nuestro país, siendo la frecuencia alélica de 0,231 en los pacientes tuberculosos y 0.130 en los dadores sanos. El 20% de los pacientes (los que presentan el SNP) poseen un tiempo de negativización del esputo más lento y los dadores sanos que presentan el SNP muestran menor producción de ROS en neutrófilos. Conclusión, estos estudios revelan una posible relación de la mutación con la susceptibilidad u progresión de la enfermedad tuberculosa, debiéndose aumentar el número de individuos para que la estadística sea robusta.

## III. Palabras clave: Dectin-1, tuberculosis, polimorfismos

#### IV. Abstract

Genomic studies show that host genetics strongly influence susceptibility to tuberculosis disease, for instance single nucleotide polymorphisms (SNPs) in molecules involved in immunity against *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). A DECTIN-1 SNP (Y238X, rs16910526) generates an early stop codon, leading to the loss of the last 10 amino acids of the receptor, decreasing its expression in membrane and its binding to different ligands. This SNP is clinically associated with recurrent cutaneous mycoses; however, its association with tuberculosis disease has not been studied to date, nor is its genotypic frequency known in South America. We have previously demonstrated that *Mtb* induces the generation of reactive oxygen intermediates (ROS) in neutrophils and dendritic cells through interaction with Dectin-1, which favors the immune response against mycobacteria. Thus, decided to study whether the presence of the mutation affects tuberculosis disease, the patient's symptoms, in vitro cellular parameters, and we also evaluated the genotypic frequency in the population studied. For this, DECTIN-1 was amplified by PCR from complementary DNA isolated from blood samples from patients and healthy donors, and were subsequently sequencing to see the presence of the mutation; the expression of Dectin-1 in the neutrophil membrane and the level of intracellular ROS (by oxidation of DHR123 in response to *Mtb* insufficiency ( $1 \times 10^8$  bacilli/ml) were evaluated by flow cytometry. We observed that TB patients showed lower Dectin-1 expression and ROS production compared to healthy donors ( $p < 0.02$ ). The heterozygous haplotype of the SNP has a genotypic frequency of 33% in the population in our country, with an allelic frequency of 0.231 in TB patients and 0.130 in healthy donors. Those patients with the SNP (20%) showed a slow sputum negativization time whereas those healthy donors with the SNP showed a lower production of ROS in neutrophils. Conclusion, these studies reveal a possible relationship between said mutation and the susceptibility or progression of tuberculosis disease. The number of individuals should be increased for the statistics to be robust.

V. Key words: Dectin-1, tuberculosis, polymorphisms

## VI. Introducción

Con más de un tercio de la población mundial infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y tres millones de personas muertas por la enfermedad cada año, la tuberculosis (TB) es un problema global emergente y sigue siendo en la actualidad un gran problema de salud pública (1). Todas las especies de *Mycobacterium* comparten una pared celular característica, más gruesa que la de muchas otras bacterias, hidrofóbica, cerosa, y rica en ácidos micólicos, responsables de más del 50% de su peso seco y están distribuidos como una gruesa capa mayormente en la cara externa de la pared celular (2). El compartimiento más externo de la envoltura celular de las especies de micobacterias patógenas, consiste en una estructura débilmente unida llamada cápsula compuesta por hidratos de carbono y proteínas con pequeñas cantidades de lípidos (3, 4). Interacciones complejas de *Mtb* y los factores genéticos del hospedador desempeñan un papel fundamental en la infección por TB ya que la respuesta inmune celular del huésped determina si una infección se hace latente o progresa hacia la enfermedad activa. Estudios epidemiológicos que analizan polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en los genes de los pacientes con TB encontraron SNPs en el gen de TLR2 que afectan susceptibilidad a la TB, ya que *Mtb* y sus componentes de pared son reconocidos por TLR2, representando las variantes genéticas más abundantes (5). Otros estudios epidemiológicos analizan polimorfismos en la proteína 1 del macrófago (NRAMP1), asociado a la resistencia natural, en el receptor de tipo Toll 2 (TLR2), en la interleuquina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el antagonista del receptor de interleuquina-1, IL-10, el receptor de vitamina D (VDR), DC-SIGN, en la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1), el dominio de unión a oligomerización de nucleótidos 2 (NOD2), Interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lectina de unión a manosa (MBL) y proteína surfactante A (SP-A). También otros receptores de membrana celular, tales como el receptor de manosa (MR, CD206), el receptor 3 del complemento (CR3, CD11b/CD18), y receptores citosólicos intracelulares, tales como NOD1 y NOD2. Los resultados han sido variables según la cohorte, salvo para TLR2 cuyas mutaciones SNPs afectan la susceptibilidad a la TB, incluyendo R753Q (exón), R677W (exón), \ Delta 597T / C y P631H. R753Q que influencia la progresión de la TB en los niños y TLR2 597T / C fuertemente asociado con la TB miliar (5)

Nuestro grupo investiga los mecanismos que intervienen en la generación del estallido respiratorio y las consecuencias que este proceso tiene en la enfermedad tuberculosa, propiciando el montaje de la respuesta inmune adaptativa. Demostramos que la interacción simultánea de *Mtb* con Dectin-1 y TLR2 induce la generación de ROS (1) en los neutrófilos

llevando a la activación de p38 MAPK y Syk conduciendo a la apoptosis de la célula (6), y 2) en la dendrítica induciendo la maduración y favoreciendo la presentación antigénica (7). Sin embargo la relación del polimorfismo en Dectin-1 con la enfermedad tuberculosa no ha sido estudiada hasta hoy. Dectin-1 es una proteína transmembrana de tipo II de 28 KDa con un único dominio CRD, que se expresa en macrófagos, monocitos, neutrófilos y algunas células T. El papel de Dectin-1 en la regulación de una respuesta inmune sólo se ha abordado en el contexto de actividad anti-fúngica debido en gran parte a que tiene capacidad de unir  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 que están expresados sobretodo en levaduras, hongos, plantas y un pequeño número de bacterias (8). Un polimorfismo funcional de un solo nucleótido (SNP) en Dectin-1 (Y238X, rs16910526) genera un codón stop temprano, dando lugar a la pérdida de los últimos 10 aminoácidos del dominio de reconocimiento de carbohidratos del receptor reduciendo su capacidad para unirse a  $\beta$ -glucano (9, 10). Se investigó la prevalencia de la mutación en cuatro cohortes de personas sanas de diversos grupos étnicos, cada uno representando poblaciones de los principales continentes: 138 blancos de Holanda ascendencia (Europa), 99 personas de Tanzania (África), 100 chinos Han (Asia) y 105 indios trío (nativos americanos) de Surinam (América del Sur). Dectin-1 fue secuenciado completamente en la población holandesa, siendo Tyr238X la única mutación identificada. La población holandesa tenía una frecuencia alélica de 0.069, y el población de Tanzania, 0,035; todas las personas con la mutación eran heterocigotos y estuvo ausente en las poblaciones de China y Surinam. Esta variante ha sido registrada en la base de datos dbSNP, como rs16910526.

Clínicamente, se encontró que este polimorfismo estaba asociado a la colonización con especies de *Cándida* en trasplantados con células madre hematopoyéticas y a micosis cutáneas recurrentes, provocando además una baja expresión del receptor en membrana, una reducción en la unión a  $\beta$ -glucanos, y una producción defectuosa de IL-17, TNF, e IL-6 (11). Varios estudios también han demostrado una acción conjunta de Dectin-1 con TLR2 no solo en hongos sino especies de *Mtb* (12). El hallazgo de esta mutación en dectin-1 en personas de Europa y África conduce a ciertas hipótesis: en primer lugar, la identificación de este polimorfismo en todas las poblaciones africanas evaluadas sugiere que esta es una mutación antigua que muy probablemente surgió hace más de 60.000 años, antes de la división de las poblaciones humanas modernas a finales Paleolítico (13). En segundo lugar, la prevalencia relativamente alta del polimorfismo en estas poblaciones puede representar una susceptibilidad genética importante a variadas infecciones fúngicas.

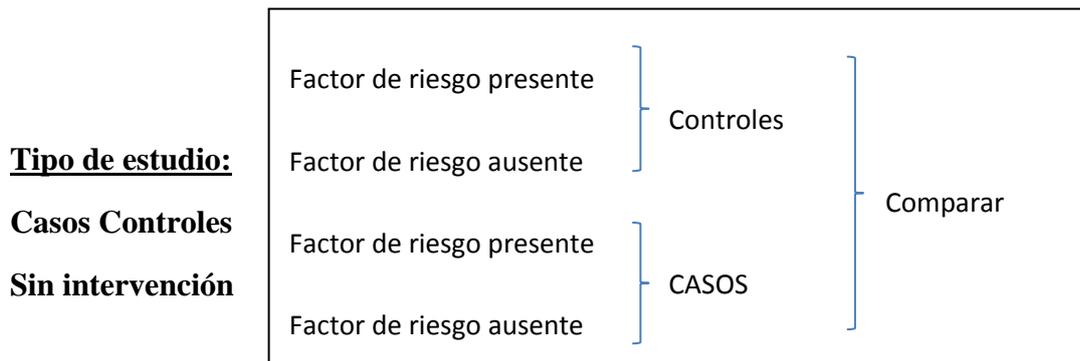
Considerando que se ha encontrado una asociación del polimorfismo en Dectin-1 con enfermedades humanas por infecciones con diferentes hongos y habiéndose demostrado que de

dicho receptor participa en la generación de ROS inducida por *Mtb* afectando la funcionalidad de las células del sistema inmune, nuestra hipótesis propone que existiría una asociación directa entre la presencia del polimorfismo y la incapacidad de inducir estallido respiratorio en las células del sistema inmune lo que incidiría en respuesta inmune innata contra la enfermedad tuberculosa.

Así pues, nos propusimos como objetivo evaluar la frecuencia del polimorfismo en la población, y la posible asociación entre la presencia de dicha mutación con la enfermedad tuberculosa, en relación a la clínica del paciente (el tiempo de negativización del esputo y de cultivo, datos de radiografía de tórax, status de la PPD), parámetros funcionales in vitro (estallido respiratorio en neutrófilos y su estado de activación) y expresión de Dectin-1 en la membrana del neutrófilo.

## VII. Metodología

La variable a evaluar es la presencia o no del polimorfismo funcional de un solo nucleótido (SNP) en Dectin-1 (Y238X, rs16910526), en población de participantes con tuberculosis, contactos sanos PPD+, dadores sanos.



### Muestras de sangre venosa

25 muestras de participantes sanos Hemocentro Buenos Aires. Edad promedio 35±5.

25 muestras de pacientes participantes con tuberculosis activa sensible drogas de la División Tisioneumonología del Hospital de Infecciosas Dr. Francisco J. Muñiz. Edad promedio 25±5.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado tanto para la extracción de las muestras de sangre como para participar en el estudio de investigación sugerido por el Comité de Ética del Hospital Francisco Muñiz.

Se realizó la venopuntura con agujas 19G estériles (mariposa) y jeringas estériles y se obtendrá un volumen de 30 ml de sangre venosa, en tubos cónicos con heparina.

Criterio de inclusión, exclusión y eliminación: La clasificación de los individuos participantes fue realizada por los médicos involucrados en el proyecto. Los individuos son diagnosticados por la presencia de síntomas recientes de tuberculosis, por la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en esputo y confirmada por cultivos positivos para *Mtb* y por radiografías de pulmón. Se excluyeron aquellos con serología positiva para HIV y/o otras enfermedades infecciosas. Se tuvo en cuenta de las historias clínicas los siguientes datos para establecer correlación entre con la presencia de la mutación en el gen de Dectin-1.

- Edad y sexo - Etnia
- Fecha de negativización del esputo y de cultivo.
- Datos de RX de tórax - Status de la PPD.
- Drogas anti-TB empleadas - Hemograma completo.

Traslado de las muestras: será realizado de acuerdo a los lineamientos para el transporte de muestras biológicas por un integrante del IMEX-CONICET que participa en el proyecto. 1º) Recipiente primario estanco, a prueba de filtraciones, etiquetado, que contiene la muestra. El recipiente será envuelto en material absorbente. 2º) Recipiente secundario estanco, a prueba de filtraciones, que encierra y protege el recipiente primario. Se usará suficiente material absorbente para proteger a todos los recipientes primarios y evitar choques entre ellos. 3º) Recipiente externo de envío. El recipiente secundario se colocará en un paquete de envío que protege al recipiente secundario y su contenido de los elementos externos, tales como daño físico y agua. Los formularios con datos, cartas y otras informaciones de identificación de la muestra se colocarán pegados con cinta adhesiva en el exterior del recipiente secundario.

#### Extracción de ADN de las muestras de los participantes

Se emplearon Kits de extracción *Puro Genomic DNA de PB-L (productos biológicos) Cat n°: SA05*. Brevemente, 200 µl de sangre entera se trató con 20 µl de proteinasa K mezclando con vórtex. Luego, se agregó 200 µl de buffer GA mezclando con vórtex incubándose 15 minutos a 56° C homogenizando de vez en cuando. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 30 segundos, luego de lo cual se agregó 200 µl de etanol mezclando con vórtex durante 15 segundos. Se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 30 segundos y el sobrenadante se pasó a la columna de purificación centrifugándose a 12000 rpm por 30 segundos. Descartamos lo eluido en el tubo colector agregándose luego 500 µl de buffer GB y centrifugándose a 12000 rpm por 30 segundos. Lo eluido se descartó en el tubo colector centrifugándose a 12000 rpm por 2 minutos (para eliminar los restos de buffer que puedan quedar en la columna). Luego se puso la columna de purificación en un tubo limpio de 1,5 ml agregándose 100 µl de buffer de elusión e

incubándose por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos y se guardó el ADN obtenido a -20°C.

#### Amplificación del ADN de las muestras de los participantes

La secuencia de dectin-1 se amplificó con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando *primers* específicos para la región donde se estudiará la presencia de la mutación puntual (SNP).

*Primers:* Sense: 5`AATCACAGCCTCTCCCTTCA 3`

Reverse: 5`GATTTAAGCCTCCTTTTCCAA 3`

Se utilizó un polimerasa de alta fidelidad – PFU ADN polimerasa de PB-L (productos biológicos) Cat n°: EA00201-100 U. También se utilizó dNTPs para la amplificación – Set de dNTPs ultra puro de PB-L (productos biológicos) Cat n°: IK0101.

Las muestras una vez amplificadas se envían a secuenciar a la empresa Macrogen.

#### Separación de las poblaciones celulares

Se separaron las diferentes poblaciones celulares, diluyendo la sangre al medio con solución fisiológica (SF) y sembrándose sobre una solución de Ficoll-Hypaque (HyClone, UT, USA) centrifugándose a 350 g durante 40 minutos a 4° C. Se obtiene finalmente una interfase conteniendo las células mononucleares (CM) y un sedimento de eritrocitos y granulocitos.

#### Fracción de eritrocitos y granulocitos: purificación de los neutrófilos (PMN)

El sedimento resultante de gradiente de Ficoll-Hypaque se diluye al medio con SF y luego se le agrega dextrán al 6 % en fisiológica, en una proporción de seis volúmenes de suspensión celular diluida, a 1 volumen de dextrán. Se deja sedimentar 20 minutos a temperatura ambiente y luego se colecta el sobrenadante rico en PMN removiendo los glóbulos rojos por lisis hipotónica durante 1 minutos a 4° C, restituyendo inmediatamente la isotonicidad. Las células purificadas se lavan inmediatamente y se suspenden a una concentración de  $3 \times 10^6$  células por mililitro (cel/ml) en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, NY, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% inactivado por calor (Gibco, NY, USA) conteniendo penicilina/estreptomicina (100 U/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). La viabilidad celular resultante se determinó por la exclusión del colorante vital, azul de tripán y la pureza de la población de PMN resultante por la examinación morfológica con tinción de Wright-Giemsa, el recuento en cámara de Neubauer empleando el colorante de Türk y por el patrón observado por un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

### Detección de antígenos en la superficie celular

Se evaluó la expresión de Dectin-1 y TLR2 en los PMN por medio de la marcación con anticuerpos anti-TLR2-FITC (clon TL2.1) y anti-Dectin-1 (clon 259931) humano hecho en ratón. Se evaluó también la expresión de marcadores de activación CD11b y FcγRIIIb (CD16) en la superficie de los PMN expuestos o no al *Mtb* por fluorescencia directa usando anticuerpos anti CD11b y CD16 hechos en ratón conjugados a fluoróforos. Para determinar la auto-fluorescencia y pegado inespecífico, se utilizó como control anticuerpos de especificidad irrelevante (control isotipo). Para esto, se incubaron  $5 \times 10^5$  células con el correspondiente anticuerpo durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron, y se fijaron con 50  $\mu$ l de una solución de paraformaldehído (PFA) al 1 %. Se recolectaron 10.000 eventos en un citómetro de flujo en el modo lineal para Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC), y amplificación logarítmica para FL-1 y FL-2. Se empleó el software de análisis CellQuest (Becton-Dickinson) expresándose los resultados como porcentaje de células positivas o intensidad media de fluorescencia (IMF).

### Ensayo de estallido respiratorio por oxidación de Dihydrorhodamina 123 (DHR)

El nivel de ROS intracelular, se determinó por la oxidación del colorante no fluorescente Dihydrorhodamina 123 (DHR) a Rhodamina 123 (fluorescente). La DHR se llevó a una concentración de 20  $\mu$ g/ml en DMSO almacenándose en alícuotas a  $-70$  °C hasta su uso. Para el ensayo en PMN, se incubaron  $5 \times 10^5$  PMN con 100  $\mu$ l DHR (5  $\mu$ g/ml) durante 15 minutos a 37° C, luego de lo cual, las células se enfrentaron a *Mtb* ( $1 \times 10^8$  bacilos/ml) durante 90 minutos adicionales, en una relación (1:1) *Mtb*:PMN.

### Descarte del material biológico

El descarte del material biológico de los participantes se realizó siguiendo las normas establecidas por el comité de Bioseguridad del Instituto de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina. Los mismos serán tratados como residuos patogénicos (Manual de Gestión de Residuos Patogénicos, Ley 154, 18 febrero 1999).

### Estadística

Se calcularon los *odds ratio* (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95% utilizando análisis de regresión múltiple. Los análisis de asociaciones de riesgo para el polimorfismo son ajustados por recuento de glóbulos blancos, fecha de negativización del esputo y de cultivo, datos de RX de tórax, nivel de radicales oxígeno, activación celular. Las características cuantitativas se expresaron por el valor de la mediana. Se empleó la prueba t de Student (paramétrica, de dos colas) y la prueba de  $\chi^2$  para identificar diferencias estadísticas cuando fue apropiado. El nivel de significación se considera estadísticamente significativo con un valor de p de 0,05.

## VIII. Resultados

### VIII-I. Evaluación del estado de las poblaciones celulares en dadores sanos y pacientes TB

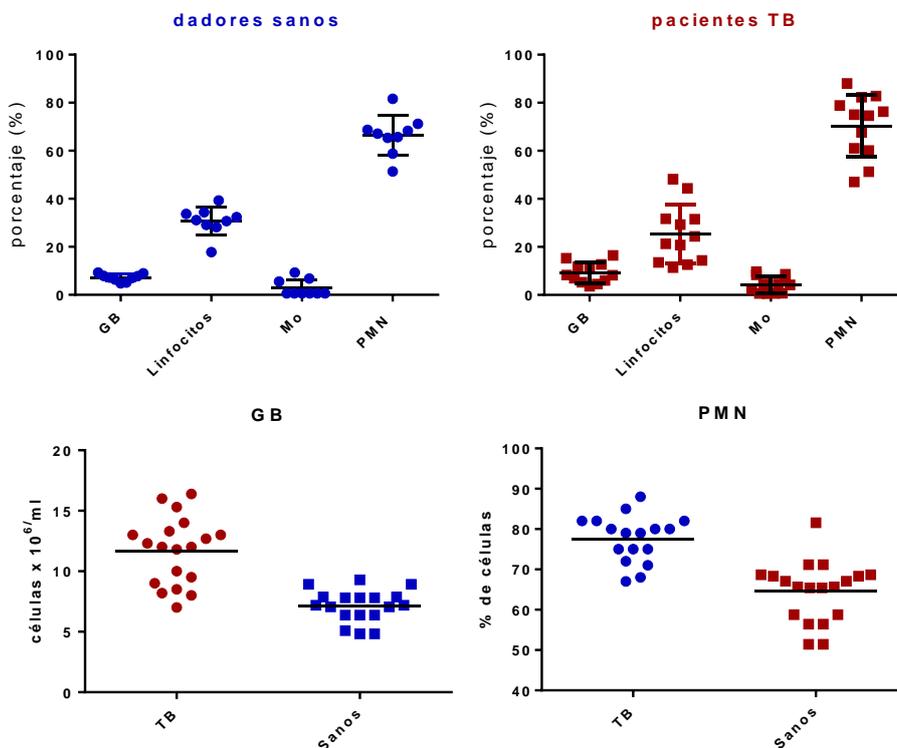


Figura 1. Las poblaciones celulares en sangre periférica de dadores sanos y pacientes con TB fue evaluado mediante recuento en coulter hematológico. WBC: glóbulos blancos totales; Lym: linfocitos (%), Mo: monocitos (%), Gr: neutrófilos (PMN, %). Pacientes (TB) presentan WBC y PMN significativamente mayores que los dadores sanos (HS), \* $p < 0.002$ .

Las muestras a estudiar fueron evaluadas para determinar diferencias entre las poblaciones celulares. Se realizó el recuento celular dando como resultado una diferencia significativa en el recuento de blancos totales y también el porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) en los pacientes tuberculosos (Figura 1), algo que ya se había documentado en trabajos anteriores de nuestro grupo (14). Los pacientes presentan elevados los glóbulos blancos, que se debe al significativo aumento de los PMN, característico de las formas graves de TB.

### VIII-II. Evaluación de la presencia del SNP y frecuencia alélica en la población total

Se diseñaron los *primers* para la amplificación de la región del ADN que comprende a la mutación del gen DECTIN-1 (Y238X, rs16910526), basándose en trabajos anteriores (11). Se muestran los nombres, secuencias y temperaturas de hibridación correspondientes a los *primers* destinados a amplificar una región del exón 6 del gen en la secuencia de ADN de *Homo sapiens*.

Los *primers* fueron solicitados para su síntesis a *Macrogen Services*. Además se llevó a cabo la puesta a punto de la reacción de amplificación, y se determinó el perfil de ciclado a utilizar. A continuación se realizaron las reacciones de amplificación para las 24 muestras obtenidas y se observó una buena cantidad y calidad de producto (Figura 2).

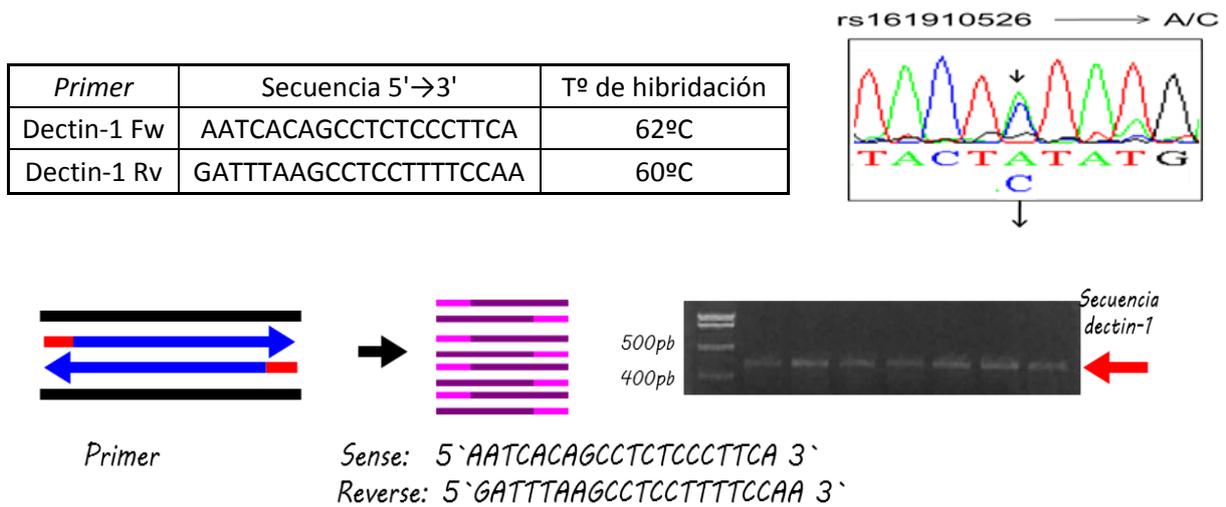


Figura 2: Figura representativa de las electroforesis en gel de agarosa 2% m/v. Se señala con una flecha el producto amplificado, de tamaño aproximado de 250 pares de bases. Frecuencia génica del SNP: 0,033

Al estudiar las secuencias obtenidas de Dectin-1 en las muestras de los pacientes, se determinó la frecuencia del haplotipo en la población total estudiada. La mutación que se está estudiando es la Y238X, rs16910526 que consta de un cambio de Adenina por Citocina. Los cromatogramas resultantes fueron analizados para corroborar una buena calidad de la técnica y se acotaron las zonas de estudio. Las secuencias resultantes fueron analizadas con el programa DNA Sequence AssemblerV5(<http://www.dnabaser.com/download/DNA-Baser-sequence-assembler/index.html>). Se encontró que el haplotipo heterocigota del SNP se encuentra en un 17% de la población de nuestro país, y la frecuencia génica es de 33%.

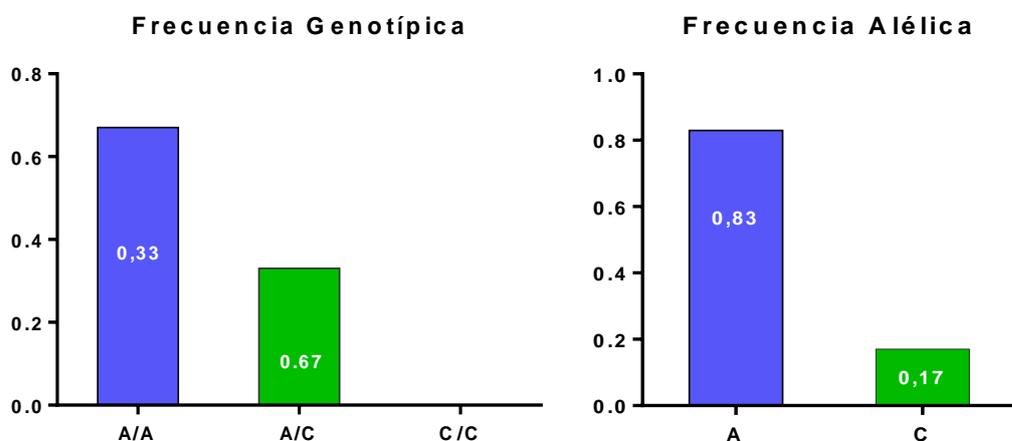


Figura 3: Frecuencia genotípica y frecuencia alélica del SNP Y238X, rs16910526 en la población general estudiada (n=40)

### VIII-III. Evaluación de la expresión de Dectin-1 en PMN de TB y dadores sanos

Ha sido descrito que las células heterocigotas para el polimorfismo Y238X presentan disminuida la expresión de Dectin-1 en la superficie de la célula (11). Los PMN fueron purificados y se evaluó la expresión de Dectin-1 en su superficie por medio de la marcación con anticuerpos anti-Dectin-1-PE (clon 259931) humano hecho en ratón. La Figura 3 muestra que, si bien han sido variables, presentan una menor expresión del receptor en los PMN de los pacientes con TB comparado con la población de dadores sanos, quienes podrían ser tanto susceptibles o no a la enfermedad.

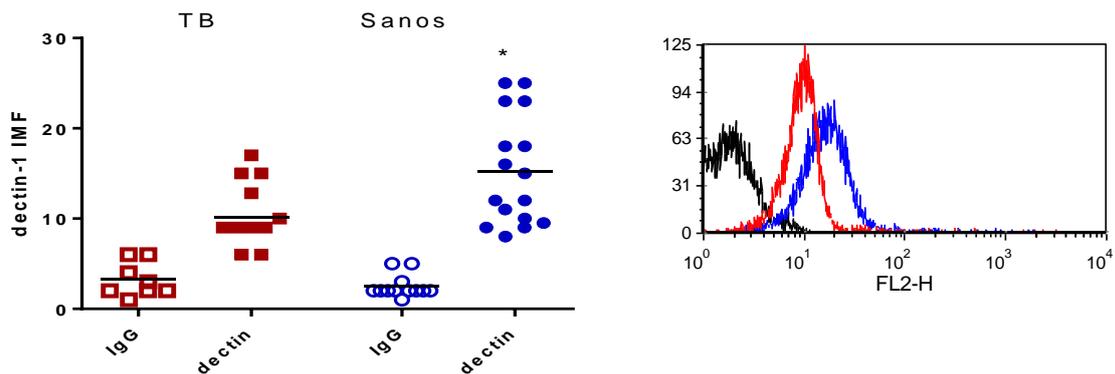


Figura 3. La expresión de Dectin-1 en neutrófilos de sangre periférica de dadores sanos y pacientes con TB fue evaluada mediante marcación con anticuerpos anti-Dectin-1-PE y el correspondiente isotipo inespecífico, por citometría de flujo. Los pacientes TB (rojo) presentan en general menor expresión de Dectin-1 por célula (MFI) respecto de dadores sanos (azul) ( $p < 0.02$ ).

### VIII-IV. Evaluación de la generación de ROS en PMN de TB y dadores sanos

Por otra parte, resultados obtenidos en nuestro grupo mostraron que la generación de ROS requiere la interacción simultánea de *Mtb* con Dectin-1 y TLR2 induciendo la activación de los neutrófilos y apoptosis de la célula, y en la dendrítica induce la maduración favoreciendo la presentación antigénica. A fin de poder buscar una asociación con la presencia del polimorfismo evaluamos primero los niveles de ROS en la población de PMN de sanos y TB, y observamos que los sanos son capaces de inducir niveles significativamente mayores de ROS en respuesta al *Mtb* ( $*p < 0,02$ ) y se asocia a la mayor expresión de Dectin-1 ( $*p < 0.02$ ).

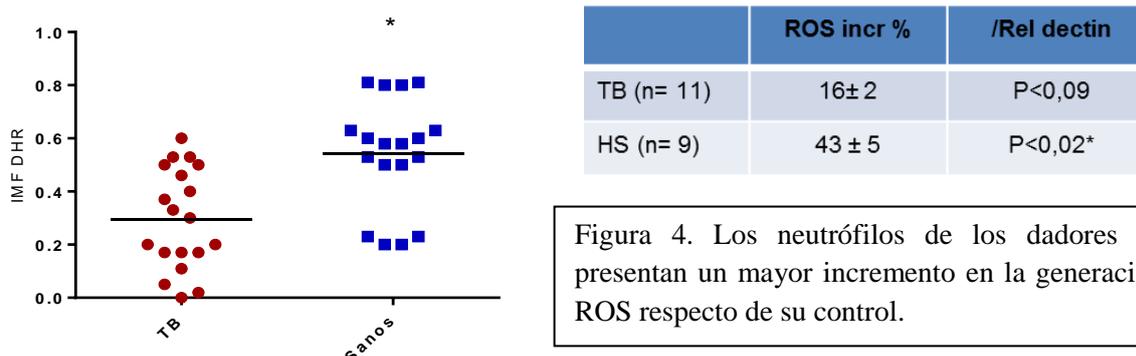


Figura 4. Los neutrófilos de los dadores sanos presentan un mayor incremento en la generación de ROS respecto de su control.

### VIII-V. Presencia del SNP en pacientes TB y dadores sanos

Se determinó la frecuencia del haplotipo en la población de pacientes y dadores sanos separadamente y encontramos que la población de pacientes TB tienen una frecuencia genotípica de 0,46 (mutación Y238X, rs16910526) que es significativamente (OD ratio 2,4285;  $p < 0.005$ ) mayor a la frecuencia genotípica en los dadores sanos (0.24), mientras que no se encontró el genotipo CC en ningún caso.

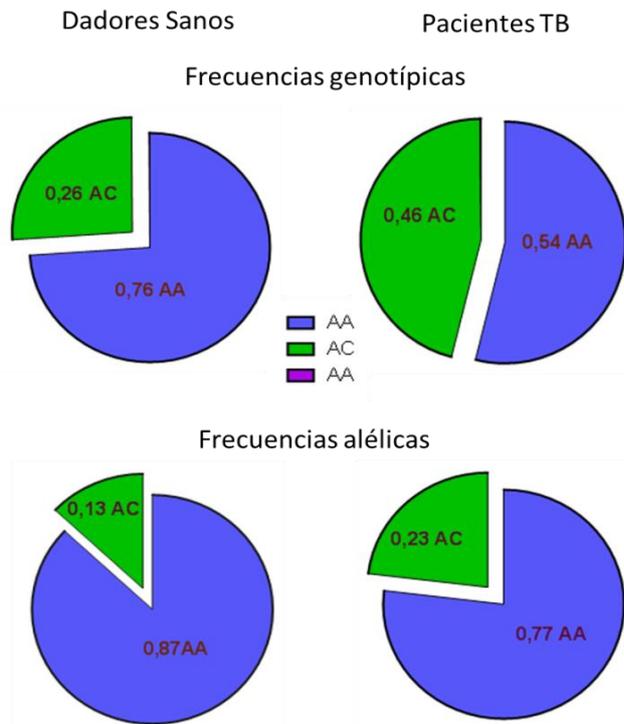


Figura 5. Gráfico que representa la distribución genotípica y alélica del SNP Y238X, rs16910526 en ambas poblaciones. Los valores de p se calcularon mediante la prueba de homogeneidad  $\chi^2$ . Ambas poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW).

### VIII-VI. Frecuencia alélica en adores sanos y relación con la producción de ROS

Encontramos que, aquellos dadores sanos que presentaban la mutación, exhibían un menos nivel de ROS inducido por *Mtb* (0.05)

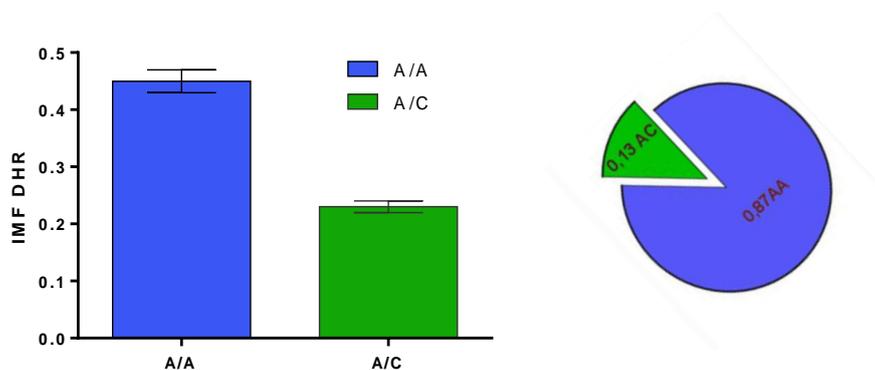


Figura 6. Presencia del SNP Y238X, rs16910526 en dadores sanos y capacidad de generar estallido respiratorio (ROS) en el PMN en respuesta a *Mtb*.

## IX. Conclusión y discusión

La susceptibilidad a sufrir infecciones está fuertemente ligada por factores ambientales y genéticos. Los factores genéticos podrían deberse a determinados polimorfismos que afectan al sistema inmune y comprometen la función de reconocimiento de patógenos.

Nuestro grupo investiga los mecanismos que intervienen en la generación del estallido respiratorio y las consecuencias que este proceso tiene en la enfermedad tuberculosa, propiciando el montaje de la respuesta inmune adaptativa. Demostramos que la interacción simultánea de *Mtb* con Dectin-1 y TLR2 induce la generación de ROS 1) en los neutrófilos llevando a la activación de p38 MAPK y Syk conduciendo a la apoptosis de la célula (6), y 2) en la dendrítica induciendo la maduración y favoreciendo la presentación antigénica (7). El papel de Dectin-1 en la regulación de una respuesta inmune sólo se ha abordado en el contexto de actividad anti-fúngica debido en gran parte a que tiene capacidad de unir  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 que están expresados sobretodo en levaduras, hongos, plantas y un pequeño número de bacterias (8). Sin embargo la relación del polimorfismo en DECTIN-1 con la enfermedad tuberculosa no ha sido estudiada hasta hoy. Así, planteamos la hipótesis de que la presencia del polimorfismo (Y238X, rs16910526) que genera una pérdida de parte del dominio de reconocimiento con los ligandos (9, 10) podría implicar un aumento del riesgo de infección tuberculosa.

Los resultados obtenidos sobre la muestra de pacientes mostraron que la presencia del polimorfismo de DECTIN-1 es más frecuente en los pacientes que desarrollan infección tuberculosa que en la población sana (OR 2,4285;  $p < 0.005$ ). Dichos pacientes, cursan con neutrofilia, que se traslada a un recuento elevado de glóbulos blancos. A pesar del elevado número de neutrófilos (PMN), estos tienen menor capacidad de inducir estallido respiratorio en promedio ( $p < 0.02$ ), que se relaciona a la menor expresión del receptor Dectin-1 ( $p < 0.02$ ), el cual está involucrado en el reconocimiento de la bacteria y transducción de las señales que activan la NADPH oxidasa, enzima que interviene en la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS). Los ROS son tóxicos para gran variedad de microorganismos y por eso son importantes en la eliminación de los mismos. Sin embargo también tienen un rol fundamental en la señalización intracelular que lleva a la apoptosis, lo que disminuye la activación del neutrófilo, controlando la inflamación (15), y a su vez favoreciendo la presentación de antígenos por las células dendríticas para montar una buena respuesta específica de memoria contra *Mtb* (6). Dentro de la cohorte de individuos sanos, aquellos que presentan el polimorfismo, tienen menor expresión de Dectin-1 y una menor capacidad de inducir estallido respiratorio (ROS), sin embargo desconocemos si mostrarán susceptibilidad a desarrollar o no la enfermedad en caso de padecerla. Dado que, para que se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg la muestra

poblacional debe ser extensa, se necesitaría un número de pacientes y dadores sanos mayor para poder obtener resultados estadísticamente robustos y con suficiente validez externa que nos permitiera su aplicación en la práctica clínica.

Es importante señalar que, en contraste con los hongos, Dectin-1 parece no ser necesario para la fagocitosis de micobacterias. La explicación más probable es que, la pérdida de un receptor sería compensado por otros receptores. Clínicamente, se encontró que este polimorfismo estaba asociado a la colonización con especies de *Cándida* en trasplantados con células madre hematopoyéticas y a micosis cutáneas recurrentes, provocando además una baja expresión del receptor en membrana, una reducción en la unión a  $\beta$ -glucanos, y una producción defectuosa de IL-17, TNF, e IL-6 (11). En este trabajo, la identificación del genotipo rs16910526 heterocigota como biomarcador de susceptibilidad en la enfermedad tuberculosa y el papel del estallido respiratorio en la inmunofisiología de la tuberculosis podría contribuir a diseñar vacunas más eficaces y a identificar subpoblaciones de riesgo en Argentina. Además, la asociación del genotipo rs16910526 con una mayor gravedad de la tuberculosis podría colaborar en la implementación de nuevas estrategias de tratamiento dirigidas al huésped.

## XI. Bibliografía

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018 - Geneva. WHO report. 2018.
2. Daffé M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. Vol. 39, *Advances in Microbial Physiology*. 1997. 131–203 p.
3. Lemassu A, Daffé M. Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* [Internet]. 1994 Jan 15;297:351–7. Available from:<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137836&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Ortalo-Magné A, Dupont MA, Lemassu A, Andersen AB, Gounon P, Daffé M. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology*. 1995 Jul;141 ( Pt 7:1609–20.
5. Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun*. 2012;80(10):3343–59.
6. Romero MM, Basile JI, López B, Ritacco V, Barrera L, Sasiain M del C, et al. Outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis* MDR strains differentially induce neutrophil respiratory burst involving lipid rafts, p38 MAPK and Syk. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1).
7. Romero MM, Basile JI, Corra Feo L, López B, Ritacco V, Alemán M. Reactive oxygen species production by human dendritic cells involves TLR2 and dectin-1 and is essential for efficient immune response against *Mycobacteria*. *Cell Microbiol*. 2016;18(6):875–86.
8. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of  $\beta$ -glucans. *J Exp Med*. 2003;197(9).
9. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood*. 2010;116(24):5394–402.
10. Chai LYA, De Boer MGJ, Van Der Velden WJFM, Plantinga TS, Van Spriel AB, Jacobs C, et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human  $\beta$ -glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J Infect Dis*. 2011;203(5):736–43.

11. Plantinga TS, Van Der Velden WJFM, Ferwerda B, Van Spruel AB, Adema G, Feuth T, et al. Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2009;49(5):724–32.
12. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* [Internet]. 2003 May 5 [cited 2012 Jul 19];197(9):1107–17. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193968&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, et al. Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat Genet*. 2000;26(3):358–61.
14. Alemán M, Schierloh P, De La Barrera SS, Musella RM, Saab MA, Baldini M, et al. Mycobacterium tuberculosis triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving Toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculosis patients. *Infect Immun*. 2004;72(9):5150–8.
15. Romero MM, Balboa L, Basile JI, López B, Ritacco V, de la Barrera SS, et al. Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis Differ in Their Ability to Induce Respiratory Burst and Apoptosis in Neutrophils as a Possible Mechanism of Immune Escape. *Clin Dev Immunol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2012 Aug 10];2012:152546. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3388301&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>