



UNSAM

UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

**Rol de SLAMF1 en la función de los macrófagos: SLAMF1 ¿un nuevo sensor
microbiológico en las infecciones bacterianas?**

Tesis de la Alumna

ANGELA MARÍA BARBERO

Trabajo como requisito para la obtención del título de

Doctora en Biología Molecular y Biotecnología

Carrera: Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas

Universidad Nacional de San Martín

Directora de Tesis: Dra. Virginia Pasquinelli

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas (CIBA), Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA), Centro de Investigaciones y Transferencias del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (CITNOBA-UNNOBA, UNSAdA, CONICET)

Lic. Barbero, Angela María

Dra. Pasquinelli, Virginia

Mayo, 2021

Junín, Buenos Aires, Argentina.

PUBLICACIONES

Publicaciones como resultado del presente trabajo de tesis doctoral

- **SLAMF1 signaling induces *Mycobacterium tuberculosis* uptake leading to endolysosomal maturation in human macrophages.** Angela María Barbero, Aldana Trotta³ Melanie Genoula, Rodrigo Emanuel Hernández Del Pino, Martín Andrés Estermann, Josefina Celano, Federico Fuentes, Verónica Edith García, Luciana Balboa, Paula Barrionuevo, Virginia Pasquinelli. J Leukoc Biol. 2021; 109: 257–273. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MA0820-655RR>

Publicaciones en otros trabajos durante el desarrollo de esta tesis doctoral

- **The adaptive immune response to *Clostridioides difficile*: A tricky balance between immunoprotection and immunopathogenesis.** Rodrigo Emanuel Hernández Del Pino, Angela María Barbero, Laureano Ángel Español, Lorenzo Sebastián Morro, Virginia Pasquinelli. J Leukoc Biol. 2021; 109:195-210. <https://doi.org/10.1002/JLB.4VMR0720-201R>

Manuscrito en preparación: Association of IFN- γ +874 A/T SNP and hypermethylation of the -53 CpG site with Tuberculosis susceptibility. Álvarez GI, Hernández del Pino R.E, Barbero AM, Celano J, Musella R.M., Palmero D., García V.E, Pasquinelli V.

INDICE

Agradecimientos	6
Resumen.....	9
Abstract	12
Capítulo Uno. TUBERCULOSIS	15
Abreviaturas	16
Introducción	20
TUBERCULOSIS. Historia y epidemiología	21
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
Transmisión de la Tuberculosis	26
El ciclo de vida inmunológico de la Tuberculosis	27
Inmunidad Innata frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
Macrófagos. Heterogeneidad de poblaciones y mecanismos microbicidas	35
Macrófagos. Mecanismos de evasión desarrollados por <i>M. tuberculosis</i>	40
Moléculas coestimuladoras	42
Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAMF1).....	44
Objetivos	48
Objetivo General	49
Objetivos específicos.....	49
Materiales y Métodos	51
Muestras humanas.....	52
Antígenos y cepas bacterianas	52
Cultivo celular.....	53
Infección con <i>M. tuberculosis</i>	54
Citometría de Flujo.....	54
Microscopía Confocal	56
Medios condicionados	56
Ensayos de interacción entre SLAMF1- <i>M. tuberculosis</i>	57
ELISA.....	57
Análisis estadístico	58
Resultados	59
Elección del modelo de estudio	60
<i>M. tuberculosis</i> induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos	62

SLAMF1 no modula la secreción de TNF- α e IL-1 β inducida por <i>M. tuberculosis</i> en macrófagos humanos.....	67
SLAMF1 estimula la interacción entre <i>M. tuberculosis</i> y los macrófagos.....	68
SLAMF1 interactúa con <i>M. tuberculosis</i> en los macrófagos	71
SLAMF1 participa del proceso de maduración endolisosomal en los macrófagos.....	76
Discusión	80
Capítulo Dos. INFECCION POR <i>Clostridioides difficile</i>	94
Abreviaturas.....	95
Introducción.....	97
INFECCION POR <i>Clostridioides difficile</i> . Historia y epidemiología.....	98
<i>Clostridioides difficile</i>	100
Transmisión de la CDI.....	103
Microbiota.....	106
Inmunidad frente a <i>Clostridioides difficile</i>	108
Respuesta Inmune Innata	108
Macrófagos y monocitos.....	111
Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAMF1).....	117
Objetivos	119
Objetivo General	120
Objetivos específicos.....	120
Materiales y Métodos	121
Muestras humanas.....	122
Antígenos y cepas bacterianas.....	122
Cultivo celular.....	123
Citometría de Flujo.....	124
Ensayos de interacción entre SLAMF1- <i>C. difficile</i>	125
Microscopía de Fluorescencia	125
Análisis estadístico	126
Resultados	127
La cepa NAP1/BI/027 de <i>C. difficile</i> no induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos.....	128
SLAMF1 no interactúa con la cepa NAP1/BI/027 de <i>C. difficile</i>	129
La cepa NAP1/BI/027 de <i>C. difficile</i> interacciona con los macrófagos humanos por un mecanismo independiente de SLAMF1.....	132

La cepa endógena de <i>C. difficile</i> no induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos.....	135
SLAMF1 no interactúa con la cepa endógena de <i>C. difficile</i>	139
SLAMF1 no induce la interacción de la cepa endógena de <i>C. difficile</i> y los macrófagos humanos.....	140
Las cepas NAP1/BI/027 y endógena de <i>C. difficile</i> inducen la expresión de SLAMF1 en células CD14 positivas de dadores sanos y pacientes con CDI	144
Las cepas NAP1/BI/027 y endógena de <i>C. difficile</i> interaccionan con células CD14 positivas de dadores sanos y pacientes con CDI	148
Discusión	152
Conclusiones Generales	168
Bibliografía	174

Agradecimientos

A Vir por permitirme y alentarme a introducirme en el mundo de la ciencia. Por su paciencia, sus consejos, su trabajo al lado mío hasta tarde. Por su ejemplo de responsabilidad. Por seguir confiando en mí. Por darme alas.

A ustedes, mis compañeros de laboratorio por su incansable ayuda, por enseñarme, por el trabajo en grupo que es esencial. Por las charlas, las velas, la amistad, el compañerismo y todos los detalles que hacen que cada día sea más alegre de transitar. Gracias, sobre todo, por esta última etapa; por prestarme manos, oídos y cabezas. A ustedes que ya tomaron otro rumbo, pero son mi apoyo y mi diván siempre, Josecita y Martín; los adoro con el alma. Gracias por el impulso. A ustedes que están cada día y han aguantado mucho este último tiempo, Rodri, Lauri y Lore.

A todos los integrantes del CIBA. A Nati, Gasti, Lu, Dai, Ina, Fio, Anto, Ale, Mica, Giani, Sofi, Na, Agus, Sofi. V, Jose T, Caro Ch., Caro C., Lau A y Lau P por su colaboración y ayuda diaria. Gracias. A Nati y Gasti por su trabajo invaluable, por facilitarnos herramientas para hacer los experimentos. Especialmente a Nati por sus mil horas conmigo en el citómetro. A todos los que somos parte del equipo de diagnóstico de COVID-19, que hemos aprendido tanto a pesar del panorama indeseado.

A Paula Barrionuevo, Luciana Balboa, Verónica Garcia, Aldana Trotta, Melanie Genoula y Federico Fuertes por su colaboración y por recibirme siempre tan amablemente.

A las bioquímicas, médicas y médicos de los centros de salud que nos proporcionan las muestras y colaboran con nuestro grupo de investigación.

Gracias a mis amigos de la vida por estar siempre, por ser oídos tantas veces, por su ayuda a la distancia. Por ser niños durante mis cursos, congresos y clases. Especialmente a Juli, Sofi, Georgi, Mica, Cin, Eli, Yesi, Ale, Bebo. Sinceramente son una parte enorme de esto.

A mi familia que es mi pilar siempre. A mis sobrinos y ahijados que son mis soles. A mi mamá, mi papá, mis hermanos, mi cuñada y mis sobrinos mayores que han estado siempre ahí para apoyarme, por sus abrazos y sus viajes para acompañarme. A Sandra, por su amor a Margarita.

A todos por haber sido parte del momento más difícil de mi vida y haberme dado la fuerza que necesitaba. Por respetarme y por tanto amor.

A cada persona que haya pasado por mi vida en estos cinco años. Seguro hay algo de ustedes acá.

A Matías, por seguir caminando al lado mío desde donde estés. Por darme coraje en este “mundo irreal donde veo colores”. Por enseñarme a ver más allá.

A Margarita, mi fagocita preferida, por ser mi todo y darme el mejor título que puedo tener, Mamá. Gracias por llegar a mi vida, gracias por ser la maestra que sos. Por hacerme tan sencilla la vida, por tus TE AMO de cada día que lo son todo.

¡GRACIAS!

Resumen



La Tuberculosis se remonta a tiempos ancestrales, pero no constituye un problema del pasado. Cada año, millones de personas contraen la infección y mueren de Tuberculosis. Luego de la inhalación de microgotas con núcleos infecciosos, *Mycobacterium tuberculosis* accede a los pulmones donde puede manipular el sistema inmunológico y sobrevivir dentro de los macrófagos del hospedador, dando lugar al establecimiento de una infección persistente. La BCG es la única vacuna actualmente disponible, pero es de eficacia variable especialmente en regiones endémicas y sólo protege contra ciertos tipos de Tuberculosis infantil.

La infección causada por *Clostridioides difficile* (CDI) es la causa más común de diarrea infecciosa nosocomial y generalmente se desarrolla luego del uso de antibióticos que provocan disbiosis de la microbiota intestinal. Recientemente ha habido un aumento progresivo en la incidencia, severidad y complicaciones de CDI a nivel mundial. Más aun, en los últimos años, han incrementado los reportes de casos adquiridos en la comunidad y con potencial zoonótico. Paradójicamente, el tratamiento para la CDI consiste en administrar antibióticos, lo cual podría generar nuevos nichos para la bacteria.

La molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM, SLAMF1 o CD150) es un receptor transmembrana que se expresa en la mayoría de las células hematopoyéticas. Es también un autoligando cuya función clásica es la de actuar como molécula coestimuladora, pero también puede reconocer e internalizar bacterias Gram negativas y regular las funciones relacionadas al fagosoma en los macrófagos.

En Tuberculosis, SLAMF1 promueve respuestas protectoras de tipo Th1. En la CDI, su función aún permanece desconocida, pero ha demostrado tener implicancias en patologías intestinales. En este trabajo, estudiamos el papel de SLAMF1 en las funciones de los macrófagos en estas dos infecciones caracterizadas por una fuerte respuesta proinflamatoria.

Nuestros resultados muestran que tanto la estimulación con *M. tuberculosis* como IFN- γ induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos de donadores sanos y células THP-1. La coestimulación a través de SLAMF1 con un anticuerpo agonista resultó en una internalización incrementada de *M. tuberculosis* por parte de los macrófagos. Curiosamente, encontramos que SLAMF1 interactúa con *M. tuberculosis* y que colocaliza con la bacteria en el interior celular y con marcadores de endosomas tempranos y tardíos / lisosomas (EEA1 y LAMP2). Estos resultados sugieren que SLAMF1 reconoce *M. tuberculosis* y participa en el proceso de maduración endolisosomal. Interesantemente, encontramos niveles aumentados de SLAMF1 en células CD14 positivas provenientes de derrames pleurales de pacientes con Tuberculosis, lo que indica que SLAMF1

podría tener un rol activo en el sitio de la infección. Tomados en conjunto, nuestros resultados proporcionan evidencias de que SLAMF1 promueve las funciones efectoras de los macrófagos y que su modulación podría inducir la generación de respuestas inmunes protectoras que permitan un mejor control de la infección causada por *M. tuberculosis*, particularmente mejorando la internalización de esta bacteria en macrófagos humanos.

En cuanto a la CDI, encontramos que la estimulación de los macrófagos derivados de monocitos tanto con la cepa hipervirulenta NAP1/BI/027 de *C. difficile* como con una cepa endógena aislada en nuestro laboratorio, propia de la microbiota de ratones de nuestro bioterio, no modula la expresión de SLAMF1. Por otro lado, SLAMF1 no interacciona con *C. difficile* y la activación de SLAMF1 no modifica la interacción de los macrófagos con *C. difficile*. Hemos detectado a ambas cepas de *C. difficile* en células que expresaron LAMP2 y también en superficie celular al ser observada conjuntamente con CD14. Sin embargo, más estudios son necesarios para comprobar la internalización de la bacteria. Curiosamente, observamos que en monocitos de donadores sanos y pacientes con CDI, *C. difficile* si puede inducir la expresión de SLAMF1 en superficie y, además, las células muestran una gran capacidad de interacción con la bacteria; observándose que la mayoría de los macrófagos que interactúan con la bacteria expresan SLAMF1. Por lo tanto, SLAMF1 posee diferentes roles en monocitos y macrófagos en la infección por *C. difficile* y tanto la cepa endógena como la hipervirulenta disparan respuestas similares en estas células. Si bien SLAMF1 no actuaría como sensor microbiológico de *C. difficile* en macrófagos, podría tener un rol en las respuestas de los monocitos frente a *C. difficile*.

En conclusión, SLAMF1 cumple funciones diferentes en los monocitos y macrófagos humanos durante la Tuberculosis y la CDI. SLAMF1 es capaz de reconocer e interactuar con *M. tuberculosis*, pero no con *C. difficile*. La activación de SLAMF1 induce la internalización de *M. tuberculosis*, pero no modifica la interacción de los macrófagos con *C. difficile*. Sin embargo, posee un rol potencial en los monocitos en la CDI. Así, hemos contribuido a profundizar el conocimiento acerca del rol de la inmunidad innata en dos infecciones bacterianas que constituyen un grave problema para la salud pública.

Abstract



Tuberculosis dates back to ancient times, but it is not a problem of the past. Every year, millions of people contract the infection and die from Tuberculosis. After inhalation of droplets with infectious nuclei, *Mycobacterium tuberculosis* accesses the lungs where it can manipulate the immune system and survive within the host's macrophages, leading to the establishment of a persistent infection. BCG is the only currently available vaccine, but it is of variable efficacy, especially in endemic regions and only protects against certain types of childhood Tuberculosis.

Infection caused by *Clostridioides difficile* (CDI) is the most common cause of nosocomial infectious diarrhea and generally develops after the use of antibiotics that cause dysbiosis of the intestinal microbiota. Recently, there has been a progressive increase in the incidence, severity and complications of CDI worldwide. Furthermore, in recent years, reports of community-acquired cases with zoonotic potential have increased. Paradoxically, the treatment for CDI consists of antibiotics administration, which could create new niches for the bacteria.

The Signal Lymphocytic Activating Molecule (SLAM, SLAMF1, or CD150) is a transmembrane receptor that is expressed on most hematopoietic cells. It is also a self-ligand commonly known by its costimulatory functions, but it can also recognize and internalize Gram negative bacteria and regulate phagosome-related functions in macrophages.

In Tuberculosis, SLAMF1 promotes Th1 protective immune responses. During CDI, its functions are still unknown, but it has been implicated in intestinal pathologies. In this work, we study the role of SLAMF1 in macrophages' functions in these two infections characterized by a strong proinflammatory response.

Our results show that both *M. tuberculosis* and IFN- γ stimulation induce the expression of SLAMF1 in macrophages from healthy donors and THP-1 cells. Costimulation through SLAMF1 with an agonist antibody resulted in increased internalization of *M. tuberculosis* by macrophages. Interestingly, we found that SLAMF1 interacts with *M. tuberculosis* and colocalizes with intracellular bacteria and with early and late endosome / lysosome markers (EEA1 and LAMP2), suggesting that SLAMF1 recognizes *M. tuberculosis* and participates in the endolysosomal maturation process. Furthermore, we found increased levels of SLAMF1 in CD14 positive cells from pleural effusions of patients with Tuberculosis, indicating that SLAMF1 could play an active role at the site of infection. Taken together, our results provide evidence that SLAMF1 promotes the effector functions of macrophages and that its modulation could induce the generation of protective immune responses that allow a better control of *M. tuberculosis* infection, particularly by improving its internalization in human macrophages.

Regarding CDI, we found that the stimulation of monocyte-derived macrophages, both with the hypervirulent strain NAP1/BI/027 of *C. difficile* and with an endogenous strain found and isolated in our laboratory after mice intestinal dysbiosis, does not modulate SLAMF1 expression. On the other hand, the activation of SLAMF1 did not modify the ability of macrophages to interact with *C. difficile* and neither did we find any biochemical interaction between SLAMF1 and *C. difficile*. We have detected both strains of *C. difficile* within cells that expressed LAMP2 and also on the cell surface. However, more studies are needed to verify the internalization of the bacteria. Interestingly, we observed that in monocytes from healthy donors and patients with CDI, *C. difficile* induces the surface expression of SLAMF1 and, in addition, the cells have a great capacity to interact with the bacteria. Moreover, we observed a large percentage of SLAMF1 positive monocytes interacting with *C. difficile*. Therefore, SLAMF1 has very distinctive roles in monocytes and macrophages in *C. difficile* infection, and both the endogenous and the hypervirulent strain trigger similar responses in these cells. Although SLAMF1 would not act as a microbiological sensor for *C. difficile* in macrophages, it could play a key role in the monocytes responses to *C. difficile*.

In conclusion, SLAMF1 displays different functions in human monocytes and macrophages during Tuberculosis and CDI. SLAMF1 is able to recognize and interact with *M. tuberculosis*, but not with *C. difficile*. The activation of SLAMF1 induces the internalization of *M. tuberculosis*, but does not modify the interaction between macrophages and *C. difficile*. However, it has a potential role in monocytes in both infections. Thus, we have contributed to gain insight in the knowledge about the role of innate immunity in two bacterial infections that, far from being contained, constitute a serious problem for public health.

Capítulo Uno. TUBERCULOSIS

Abreviaturas



AraLAM	Lipoarabinomananos sin residuos de manosa en el extremo aminofuranosil terminal
BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CDs	Células dendríticas
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CPA	Células presentadoras de antígeno
CR	Receptores de complemento
CTLA-4	Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos (CD152)
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
ICOS	Coestimulador Inducible
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IGRAs	Ensayos de liberación de IFN- γ
LAM	Lipoarabinomananos
LRG-47 o IRGM	Proteína M de la familia GTPasa relacionada a la inmunidad

LPS	Lipopolisacárido
ManLAM	Lipoarabinomananos con residuos de manosa en el extremo aminofuranosil terminal
M-CSF	Factor estimulante de colonias macrófagos
MDR	Multi-resistentes a drogas
MOI	Multiplicidad de infección
MR	Receptor de manosa
Mtb-Ag	Lisado de <i>M. tuberculosis</i>
NKs	Células asesinas naturales
NOS2	Óxido nítrico Sintasa 2
OMP	Proteínas de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer fosfato salino
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PFA	Paraformaldehído
PMA	Forbol 12-miristato 14-acetato
PPD	Prueba intradérmica de reacción a un derivado proteico purificado de la bacteria
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones

RLC	Receptores de lectina tipo C
SAP	Proteína asociada a SLAM
SBF	Suero bovino fetal
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SLAM(F1-9)	Molécula linfocitaria activadora de señales (Miembro Familiar 1-9)
TCR	Receptor de las células T
Th	Células T colaboradoras
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
XLP	Síndrome Linfoproliferativo ligado al cromosoma X

Introducción



TUBERCULOSIS. Historia y epidemiología

La Tuberculosis es una enfermedad infecciosa que data de tiempos ancestrales. Se han encontrado referencias en antiguos escritos y lesiones de posible etiología tuberculosa en huesos de momias egipcias del año 3.700 A.C. Hipócrates, en la antigua Grecia, la llamó con el término “*phthisis*”, haciendo referencia al carácter destructivo de la enfermedad. Esta infección pulmonar crónica constituyó un grave problema de salud pública a partir de la Revolución Industrial en forma secundaria al aumento de la población en las ciudades. Durante los Siglos XVIII y XIX llegó a ser la causa del 25% de las muertes en los adultos de las ciudades de Europa occidental, y aunque se reconocía la enfermedad por sus síntomas se desconocía su etiología. Se la llamaba “gran peste blanca” y era considerada como una inevitable sentencia de muerte. En marzo de 1882, cuando la Tuberculosis causaba la muerte a una de cada siete personas que vivían en los Estados Unidos y Europa, el Dr. Robert Koch anunció el descubrimiento de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* como agente causal de la enfermedad ¹.

La Tuberculosis afecta principalmente a los pulmones, pero también puede afectar otros sitios (Tuberculosis extrapulmonar). Los primeros tratamientos consistían en reposo, alimentación adecuada e internación en hospicios. La aparición de la medicación antituberculosa cambió favorablemente la evolución de la enfermedad. En 1944 se demostró la eficacia de la estreptomycin y en 1952 se desarrolló la isoniacida. A partir de entonces, la Tuberculosis se convirtió en una enfermedad curable en la mayoría de los casos. Posteriormente con el desarrollo de la rifampicina, en la década del 60, los regímenes terapéuticos se acortaron de forma significativa. Datos actuales estiman que el 85% de los pacientes que desarrollan Tuberculosis pueden ser tratados con éxito mediante un régimen de 6 meses de duración ². Sin embargo, a pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento, la Tuberculosis continúa siendo un grave problema para la salud pública y actualmente no existe una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad en adultos, ni antes ni después de la exposición a *Mycobacterium tuberculosis*.

Exceptuando el impacto de la pandemia por COVID-19 en 2020, desde el año 2016 la Tuberculosis ha sido la principal causa mundial de mortalidad por un agente infeccioso en el mundo constituyendo, además, la causa primordial de muerte en personas infectadas con VIH. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un cuarto de la población mundial (1.7 billones de personas) se encuentra infectada latentemente con *M. tuberculosis*, causando 10 millones de nuevos casos de Tuberculosis y 1.2 millones de muertes anuales ².

El último *Reporte Global de la Tuberculosis*, emitido por la OMS en 2020, confirmó 11.907 nuevos casos notificados en nuestro país durante el año 2019 ². El boletín epidemiológico emitido por el Ministerio de Salud de la Argentina en Marzo de 2020 muestra que el 61% de los casos notificados corresponden a menores de 40 años ³. La Tuberculosis afecta a todas las jurisdicciones del país, pero se presentaron marcadas diferencias entre ellas, ubicándose 6 jurisdicciones por encima del promedio nacional: Salta, Jujuy, Ciudad de Buenos Aires, Chaco, Formosa y Buenos Aires (Fig. 1) ³. La disparidad respecto de la distribución del número de casos es notable debido a la distribución de la población, la influencia migratoria de algunos países vecinos con alta incidencia de Tuberculosis, la pobreza, el VIH y la falta de prevención y tratamiento. Cabe destacar que Buenos Aires notificó más de la mitad (60.02%) de los casos del país respecto al total de casos ³.

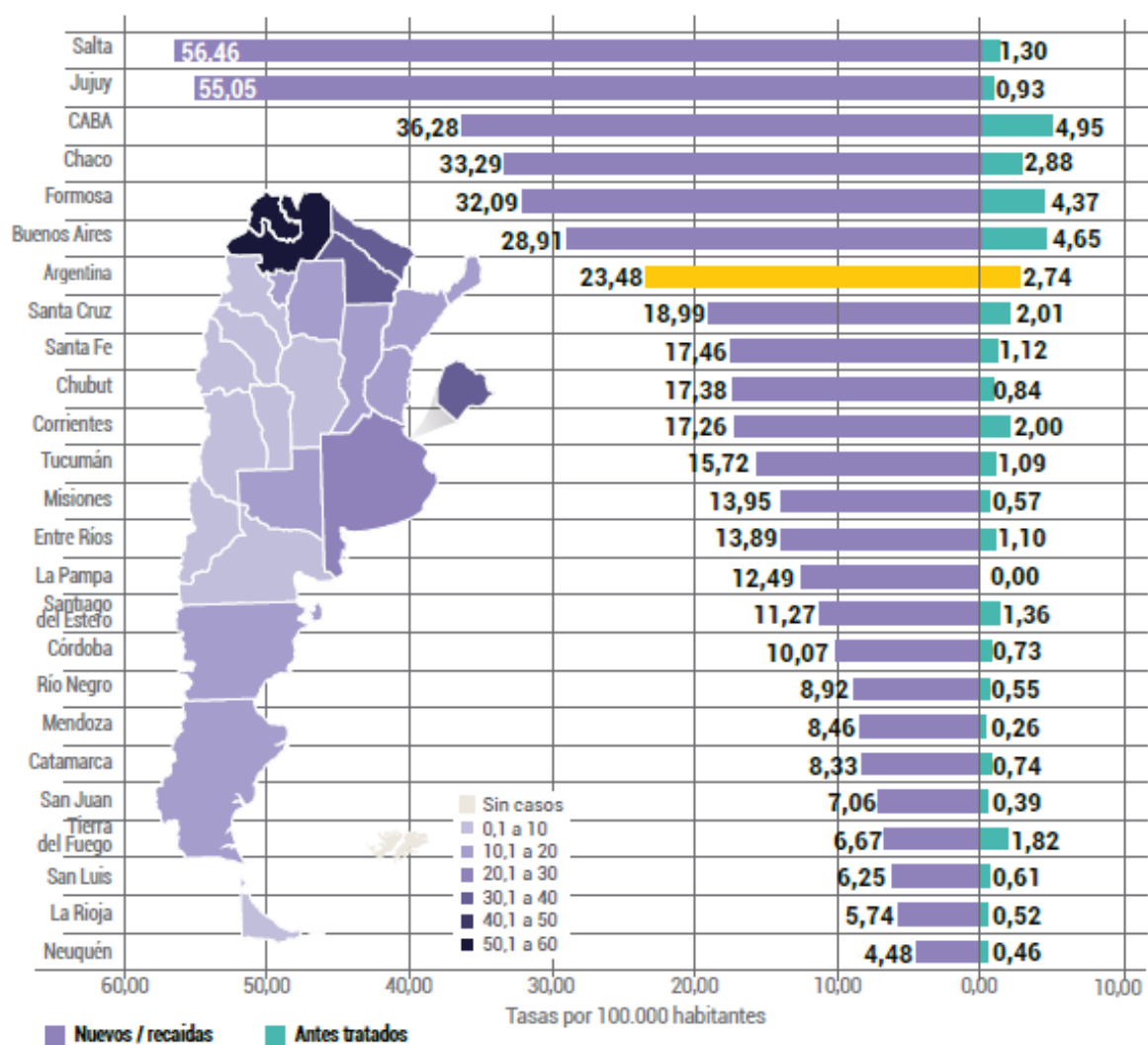


Fig. 1 Tasas de Tuberculosis por jurisdicción según clasificación al inicio del tratamiento en Argentina en el año 2018.

Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Dr. Emilio Coni", con base en los datos de los Programas de Control de Tuberculosis de las 24 jurisdicciones del país. Secretaría de Salud, Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Argentina, Diciembre de 2019.

Si bien la mortalidad a causa de la Tuberculosis ha disminuido globalmente en un 47% desde el año 1990, en nuestro país, este descenso se interrumpió a partir de 2010, siendo la tendencia estable en los últimos años. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, la Tuberculosis continúa siendo una de las amenazas más grandes a nivel mundial, ubicándose entre las 10 principales causas de muerte. Es importante remarcar que la BCG (Bacillus Calmette-Guérin), introducida en 1921, es la única vacuna disponible, pero es de eficacia variable especialmente en regiones endémicas y sólo protege contra ciertos tipos de Tuberculosis infantil.

Para poder comprender el desarrollo, la distribución y la frecuencia de la Tuberculosis en la población es necesario evaluar las interacciones existentes entre el agente causal, el hospedador y el ambiente. Diversos factores de riesgo conocidos incluyen la co-infección por el VIH antes mencionada, las inmunodeficiencias, la diabetes mellitus, la súper-población, la malnutrición y la pobreza en general. A esto se agrega el significativo problema clínico constituido por la Tuberculosis multi-resistente, lo cual se asocia con alta morbilidad y mortalidad. Estos factores se están combinando de manera tal que en los próximos años la Tuberculosis habrá causado la muerte de más de 40 millones de personas e infectado a más de cien millones de individuos, principalmente en los países en vías de desarrollo. Además, se suma el riesgo del abandono del tratamiento para la Tuberculosis, que genera no solo la persistencia de la Tuberculosis en el enfermo con la consiguiente posibilidad de seguir transmitiendo la misma, sino que es una de las causas de aparición de resistencia de los bacilos a los fármacos. En 2019, el 3,3% de los nuevos casos y el 18% de los casos ya tratados con anterioridad tenían Tuberculosis multi-resistente a drogas (MDR) a nivel mundial ². Los pacientes con Tuberculosis MDR necesitan un tratamiento con drogas de segunda línea, las cuales son más costosas, más tóxicas y menos efectivas, requiriéndose una mayor duración del tratamiento.

Mycobacterium tuberculosis

A 139 años de la identificación de *M. tuberculosis*, hemos logrado comprender que sus características, comportamiento y adaptaciones a la acción del sistema inmune aportan una gran complejidad a la enfermedad.

M. tuberculosis es un microorganismo muy resistente a agentes físicos y químicos. Presenta resistencia al frío, a la congelación, a la desecación y a ciertos ácidos, álcalis y desinfectantes principalmente debido a la hidrofobicidad de sus envolturas. Es muy sensible al calor, a la luz solar y la luz ultravioleta. Se desarrolla de manera óptima a 35-37 °C, con una lenta capacidad de

división (16-20 horas) y su crecimiento depende de las condiciones locales en las cuales se desarrolla (como la presencia o ausencia de oxígeno o el pH del medio).

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que pertenece al orden de los Actinomycetales, familia de las Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*, especie *Mycobacterium tuberculosis*. Dentro de este género se ha definido un grupo denominado complejo *M. tuberculosis* o complejo del bacilo tuberculoso, que hace referencia a un grupo de especies (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium pinnipedii*) que son genéticamente muy similares⁴. Cualquiera de las micobacterias pertenecientes al complejo de *Mycobacterium tuberculosis* puede producir la enfermedad, aunque en nuestro país el agente causal más frecuente de la enfermedad es *M. tuberculosis*. Además, varias especies poseen potencial zoonótico, siendo *M. bovis* la causa más común de la Tuberculosis zoonótica a nivel mundial².

El bacilo tuberculoso es una bacteria aeróbica estricta que mide entre 2 a 5µm de largo (longitud comparable al diámetro del núcleo de un linfocito) y 0,2 a 0,3µm de ancho, adopta forma de bastón con extremidades redondeadas, no presenta esporas, ramificaciones, ni flagelos y por lo tanto son inmóviles. No se tiñen con la coloración de Gram, pero presentan características de microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos. Sin embargo, la alta concentración de ácido micólico en la pared celular de las micobacterias le otorga a este género una característica casi única de ácido-alcohol resistencia. Para poder identificar este tipo de bacterias se utiliza la tinción de Ziehl-Neelsen, donde la bacteria queda teñida de rojo (fucsina básica) y se agrega como tinción de contraste azul de metileno. Por lo tanto, las micobacterias son comúnmente conocidas como bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

El genoma completo de *M. tuberculosis* fue descrito en 1998 por Cole S. T. y colaboradores⁵. Consiste de aproximadamente 4.4 millones de pares de bases (pb) y 3924 genes. Lo decodificado a través del genoma permite comprender características únicas de la biología del bacilo de la Tuberculosis, tales como su lento crecimiento, la naturaleza en la complejidad de su pared celular, genes relacionados con su virulencia y persistencia, y la estabilidad de su genoma. En efecto, la resistencia del bacilo en el granuloma, en microaerobiosis, frente al estrés oxidativo generado por células fagocíticas o ante la limitación de nutrientes, se debe a una gran ductilidad en el metabolismo y una gran capacidad para sintetizar proteínas dedicadas a la óxido-reducción, al transporte de oxígeno y al almacenamiento⁵.

La envoltura de *M. tuberculosis* es una estructura compleja que facilita su supervivencia bajo condiciones extremas y contribuye sustancialmente con su patogenicidad y resistencia a drogas ⁶. Está constituida por una cápsula, una pared celular y una membrana plasmática, las cuales se encargan de mediar el contacto y reconocimiento de las bacterias por parte de las células del sistema inmune (**Fig. 2**). Entre los principales componentes se encuentran el ácido micólico y los glicolípidos. En las micobacterias, los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la lipoarabinomananos (LAM). Los LAM aislados de cepas virulentas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* presentan residuos de manosa en el extremo aminofuranosil terminal (ManLAM), mientras que el LAM aislado de cepas no virulentas carece de estos residuos (AraLAM). Dichas estructuras tienen un papel fundamental en la patogénesis de la Tuberculosis y son reconocidas diferencialmente por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) ⁷.

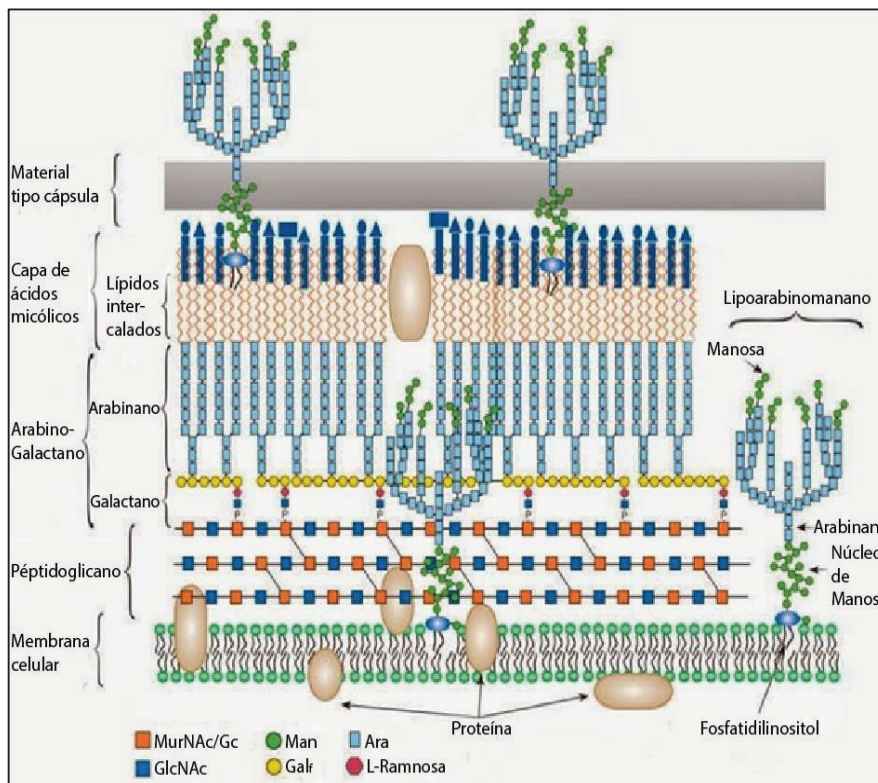


Fig. 2 Representación esquemática de la pared bacteriana de *M. tuberculosis* y sus componentes. Las micobacterias están cubiertas por un complejo formado por ácidos micólicos, arabinogalactano, péptidoglicanos y una cápsula rica en polisacáridos de arabinomanano y manano. MurNAc/Gc: ácido N-acetilmurámico/glucosamina. Man: manosa. Ara: arabinosa. GlcNAc: N-acetilglucosamina. Galf: galactofuranosa. (Adaptado de Current Topics in Medicinal Chemistry 7,475-88 (2007)).

Transmisión de la Tuberculosis

La alta complejidad de *M. tuberculosis* contribuye a que la Tuberculosis sea una enfermedad de difícil erradicación. Para frenar, e idealmente, detener la epidemia de Tuberculosis resulta crítico interrumpir la transmisión de la misma. Las intervenciones que podrían acelerar la disminución de la incidencia de la Tuberculosis y la mortalidad, deberían estar dirigidas, principalmente, a grupos y entornos de alto riesgo.

Básicamente, la transmisión de la Tuberculosis comienza con un caso fuente de la enfermedad que genera partículas infecciosas que sobreviven en el aire y que son inhalados por un individuo susceptible que puede infectarse y luego tiene el potencial de desarrollar Tuberculosis (**Fig. 3**).

El mecanismo de transmisión más común es través de la vía aerógena, por la inhalación de microgotas aerosolizadas (gotas de Pflügge) de 1-5 μ m de diámetro emitidas por un individuo con Tuberculosis activa mediante la tos, el estornudo y otros movimientos respiratorios similares producidos en actividades cotidianas. Las microgotas son entonces inhaladas y depositadas en los alvéolos pulmonares distales. Aunque el sistema inmune puede controlar la infección, el control no lleva a esterilización. De hecho, la mayoría de los individuos infectados con *M. tuberculosis* son clínicamente asintomáticos, constituyendo un estadio conocido como Tuberculosis latente⁸. Los individuos infectados latentemente representan un enorme reservorio de la enfermedad. La forma latente de Tuberculosis está definida por la ausencia de síntomas visibles de enfermedad, pero por la presencia de bacilos vivos persistentes en el hospedador. Este estado puede durar toda la vida de la persona infectada o progresar a Tuberculosis activa mediante la reactivación de la infección existente (**Fig. 3**).

El progreso de la Tuberculosis latente a activa puede detenerse en esta etapa mediante la terapia preventiva con isoniazida en ciertos casos. Estudios epidemiológicos han determinado que, sin tratamiento, un 5-10% de los individuos infectados latentemente desarrollarán la enfermedad activa en algún momento de sus vidas. Este riesgo de progresión se ve agravado por factores que comprometen el sistema inmunológico, como factores genéticos, otras infecciones como el VIH-SIDA, la diabetes, la contaminación del aire en interiores y el humo del tabaco. Se ha demostrado que la reactivación de la Tuberculosis ocurre en el lóbulo superior y más oxigenado del pulmón, que se puede curar mediante el cumplimiento de la terapia con medicamentos. Sin embargo, la Tuberculosis no tratada o mal tratada puede conducir a la formación de lesiones tuberculosas en el pulmón. El desarrollo de cavidades cerca de los espacios de las vías respiratorias permite la liberación de los bacilos a través de las vías respiratorias. Posteriormente, de forma cíclica, los

bacilos de la tuberculosis se transmiten a otros individuos para establecer la infección primaria⁹ (Fig. 3).

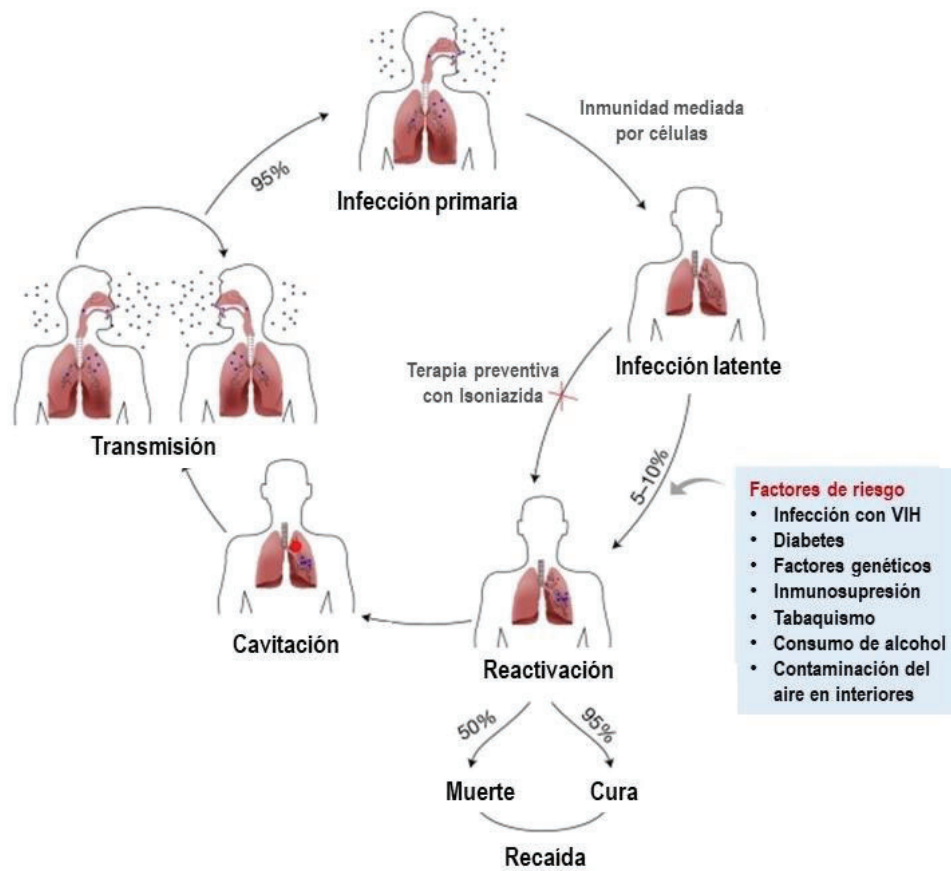


Fig. 3 Transmisión y progresión de la Tuberculosis en humanos. Datos basados en estudios clínicos-epidemiológicos. (Adaptado de *Expert Reviews in Molecular Medicine* © 2011. Cambridge University Press).

El ciclo de vida inmunológico de la Tuberculosis

Uno de los mayores desafíos en la comprensión de la inmunidad frente a *M. tuberculosis* surge de la observación de que, aunque la mayoría de los humanos y los modelos experimentales desarrollan una respuesta inmune aparentemente apropiada luego de la infección, estas respuestas inmunes no logran erradicar la bacteria. En una revisión reciente ha sido propuesto un marco de trabajo para estudiar la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*¹⁰. Este marco de trabajo se basa en la asunción de que existen múltiples estadios en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* y utiliza evidencias que validan un modelo de un ciclo de vida inmunológico para la Tuberculosis constituido por las cuatro etapas que se describen a continuación (Fig. 4).

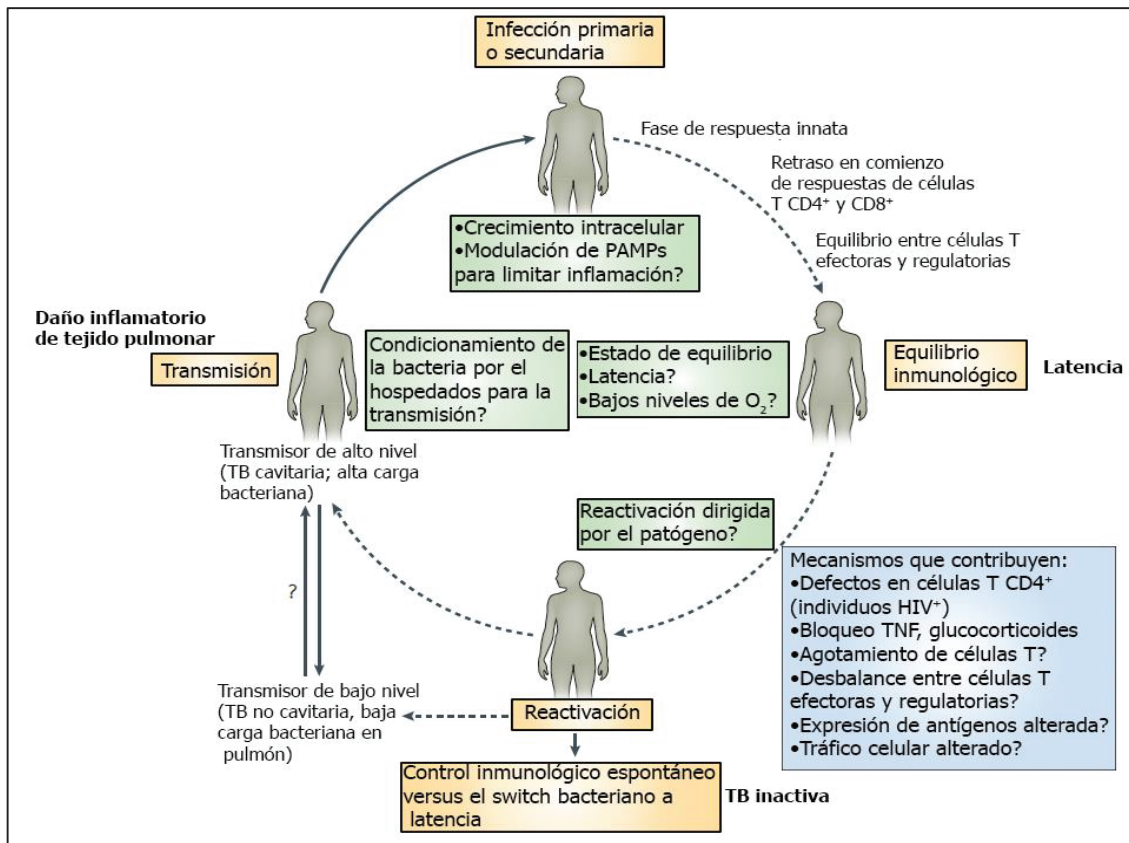


Fig. 4 Estadios en el ciclo de vida inmunológico de la Tuberculosis. La estructura para el ciclo de vida está basada en estudios clínicos, epidemiológicos e inmunológicos en humanos. Se incluyen ejemplos de algunos mecanismos inmunológicos y funciones que caracterizan a cada estadio, en los casos que son conocidos. Los signos de interrogación corresponden a aquellos casos para los cuales aún solo se tienen hipótesis. En el centro se muestran los estados conocidos de la bacteria durante los distintos estadios del ciclo. PAMP, patrón molecular asociado a patógenos. (Adaptado de *Nat Rev Immunol* 12, 581-91 (2012)).

La primera etapa se inicia con la inhalación de partículas que contienen *M. tuberculosis* diseminadas por un individuo con Tuberculosis activa y participan principalmente células de la inmunidad innata. El inóculo inhalado llega a los alvéolos y bronquiolos donde la bacteria es reconocida y fagocitada principalmente por los macrófagos alveolares, aunque otras células fagocíticas como los neutrófilos, monocitos y células dendríticas (CDs) también pueden endocitar la bacteria y desempeñar un rol en el desenlace de la infección. En otras infecciones, el reclutamiento de células fagocíticas restringe e incluso elimina los patógenos, mientras que el reclutamiento de fagocitos a los sitios de infección por micobacterias, de hecho, puede beneficiar al patógeno en los estadios tempranos de la infección, al proveer nichos celulares para la supervivencia y expansión de la bacteria ¹⁰.

Una vez en el interior celular, el crecimiento bacteriano dependerá de la capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedador y de los mecanismos microbicidas de los macrófagos. En este contexto, se establece un balance entre el hospedador, el patógeno y el tipo de respuesta inmune iniciada contra la bacteria que influenciará fuertemente en el curso de la enfermedad. Durante esta etapa, que dura de 3 a 8 semanas luego del ingreso de la bacteria a los alvéolos, los bacilos son diseminados por la vía linfática a los ganglios linfáticos regionales del pulmón. Generalmente, la respuesta inmune conduce a la contención del patógeno formando lesiones focales granulomatosas mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) por parte de los macrófagos expuestos a *M. tuberculosis* ¹⁰.

A partir de la semana 2-8 se inicia la segunda etapa (equilibrio inmunológico) durante la cual se desarrolla la inmunidad adaptativa. Una característica prominente de la respuesta inmune adaptativa frente a *M. tuberculosis* es el largo retraso que presenta en su aparición. La generación de una respuesta inmune adaptativa en Tuberculosis resulta en el arresto del crecimiento progresivo de la bacteria y puede producir síntomas transientes como fiebre y, de manera inusual, una erupción en la piel llamada eritema nudoso. La mayoría de los individuos se vuelven luego asintomáticos, no contagian y son considerados individuos con Tuberculosis latente. La Tuberculosis latente no es simplemente un estadio de estasis de la bacteria, sino un estado de equilibrio dinámico entre la bacteria y el sistema inmune del hospedador. La respuesta inmune adaptativa depende de la acción de las células T CD4, adicionalmente de las células CD8, células T restringidas a CD1, entre otras. Entre los mediadores claves se encuentra TNF- α , IFN- γ , IL-17, vitamina D, perforinas, moléculas inducidas por IFN- γ como la óxido nítrico sintetasa 2 (NOS2) y LRG-47, entre otras. El dogma central de la inmunidad protectora en la Tuberculosis incluye principalmente macrófagos, células T CD4 del perfil Th1 y linfocitos TCD8 citotóxicos (**Fig. 5**). Por otro lado, *M. tuberculosis* posee al menos tres sistemas (regulón de dormancia (Dos), factores promotores de la resucitación y parejas de genes de toxinas–antitoxinas) que regulan su estado metabólico y su crecimiento, contribuyendo con el estadio de equilibrio ¹⁰.

Luego de 4-5 semanas de infección progresiva, los granulomas microscópicos formados por la migración de diferentes tipos celulares (neutrófilos, linfocitos, macrófagos) aumentan de tamaño y se fusionan con otros granulomas, formando grandes áreas necróticas rodeadas por capas de histiocitos epiteloideas, células gigantes multi-nucleadas, fibroblastos, linfocitos y monocitos.

A pesar del pH ácido, la baja concentración de oxígeno y la presencia de ácidos grasos tóxicos, *M. tuberculosis* puede permanecer viable por décadas. En este estado de latencia, las bacterias constantemente escapan del estado durmiente reponiendo el volumen de bacilos replicativos ¹⁰.

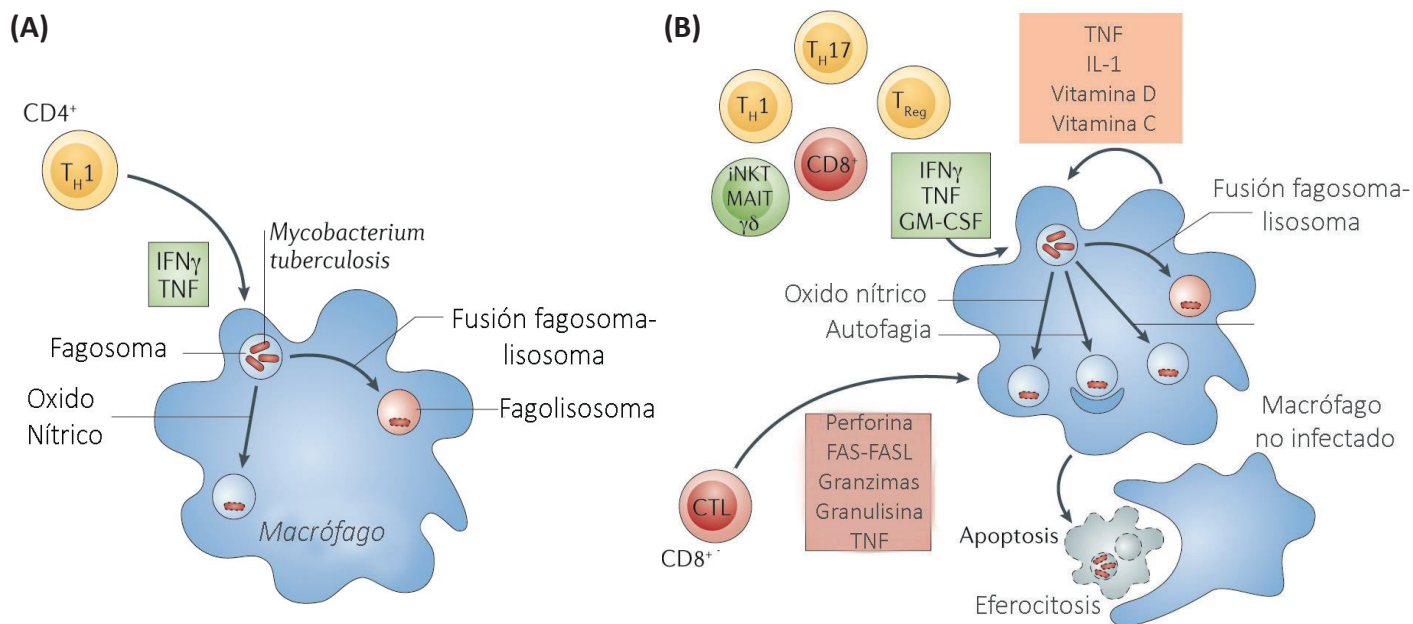


Fig. 5 A) El dogma central de la inmunidad protectora frente a la Tuberculosis. Las células T CD4 producen IFN- γ (células Th1), el cual actúa de manera sinérgica con el TNF- α (producido por macrófagos y células T), y activan la capacidad microbicida de los macrófagos. Los macrófagos son entonces capaces de restringir el crecimiento de *M. tuberculosis*. Dos vías activadas por el IFN- γ son capaces de inducir la muerte de *M. tuberculosis*: la producción de óxido nítrico y la fusión del fagosoma con el lisosoma, el cual acidifica el fagosoma que contiene la bacteria favoreciendo su eliminación. **B)** Una visión revisada del dogma central incorpora subpoblaciones de células T adicionales (células T CD4, CD8⁺ T y células T no convencionales: células T $\gamma\delta$, células MAIT y células T restringidas a CD1) e incluye mecanismos adicionales por los cuales las células T median la muerte de *M. tuberculosis*. Estos incluyen citoquinas adicionales (como GM-CSF) y la citólisis de macrófagos infectados. El mecanismo citotóxico varía y puede incluir gránulos citotóxicos, los cuales secretan péptidos antimicrobianos, como la granulisin, pero también pueden secretar granzimas disparando la apoptosis. La actividad citotóxica T (CTL) es mediada por FASL-FAS o TNF y puede llevar también a apoptosis. La apoptosis puede tener un efecto beneficioso en la resolución de la infección dado que las células apoptóticas son fagocitadas por macrófagos no infectados, los cuales son capaces de destruir las células apoptóticas, incluyendo las bacterias intracelulares. Finalmente, varios componentes de la respuesta inmune innata incluyendo a la IL-1 y algunas vitaminas, pueden actuar de manera sinérgica con las citoquinas producidas por las células T. (Adaptado de *Nature Reviews Microbiology* 12, paginas 289–299 (2014))

Comprender cómo los individuos con Tuberculosis latentes controlan la infección sin desarrollar la enfermedad es fundamental para entender los mecanismos de inmunidad protectora contra la Tuberculosis. Sin embargo, la identificación de estos individuos es dificultosa y no existe un consenso universal. El diagnóstico clásico de la Tuberculosis latente implica la conversión a positivo en la prueba de la PPD (prueba intradérmica de reacción a un derivado proteico purificado de la bacteria) que posee confiabilidad limitada, especialmente en países donde la Tuberculosis es endémica y aún se administra la BCG o donde los altos niveles de exposición a micobacterias ambientales llevan usualmente a test de PPD positivos. En los últimos años, han emergido nuevos ensayos de diagnóstico basados en la producción de IFN- γ en muestras de sangre, luego de la re-estimulación *in vitro* con antígenos específicos de *M. tuberculosis* tales

como ESAT-6 y CFP-10. Actualmente, estos ensayos de liberación de IFN- γ (IGRAs, por sus siglas en inglés) como el QuantiFERON[®]-TB se utilizan para identificar exposición previa a *M. tuberculosis* y, en países desarrollados, son considerados una herramienta de diagnóstico muy útil¹⁰. Sin embargo, no permiten diferenciar infección activa de latente.

La infección puede mantenerse en esta etapa o progresar hacia el siguiente estadio. Si la inmunidad mediada por células es apropiada, el granuloma se resolverá dejando pequeñas lesiones fibrosas calcificadas.

La tercera etapa ocurre cuando la inmunidad mediada por células no es suficiente para controlar la diseminación de los bacilos activos, dando lugar a la reactivación de la infección. Este evento puede darse muchos años después de la infección primaria y, aunque actualmente se desconoce el mecanismo exacto responsable de la reactivación, está claramente asociado a factores del sistema inmune del hospedador. Condiciones que afectan al mismo (co-infecciones, terapia con esteroides, edad avanzada, desnutrición, entre otras) favorecen este proceso. En estos casos, los macrófagos infectados pueden escapar del granuloma ocasionando diseminación hacia el ganglio linfático regional. Si la inmunidad mediada por células es inadecuada, la respuesta de hipersensibilidad tratará de combatir a los bacilos que se multiplican, pero a la vez ocasionará destrucción del tejido pulmonar llevando a la formación de cavidades. La reactivación que progresa a formación de cavidades, con una elevada multiplicación extracelular de la bacteria, favorece la propagación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes y de alta virulencia¹⁰.

Al presente, se han identificado dos mecanismos que explican la reactivación en humanos. El primero involucra las deficiencias cualitativas y cuantitativas de los linfocitos T CD4+ en individuos infectados con VIH. El segundo mecanismo es la neutralización terapéutica de TNF- α . Los efectos del bloqueo de TNF- α incluyen disrupción del granuloma, disminución de la actividad antimicrobiana y la subsecuente muerte de macrófagos; la inducción de un aumento en la frecuencia de las células T regulatorias; y la depleción de un subconjunto de células T CD8+ CD45RA+ de memoria efectora que contribuyen a la muerte de *M. tuberculosis in vitro*. En conjunto, la frecuencia incrementada de Tuberculosis en individuos infectados con VIH o tratados con agentes bloqueantes del TNF- α muestran que las células T CD4+ y el TNF- α son dos elementos claves en la inmunidad protectora frente a *M. tuberculosis*. Otras condiciones médicas que se asocian con mayor riesgo de reactivación incluyen a la diabetes mellitus, el tratamiento con glucocorticoides, la silicosis, malignidades hematológicas, cáncer, quimioterapia, uremia, gastrectomía y la edad avanzada, pero ninguna ha sido estudiada con respecto a sus efectos en los mecanismos inmunológicos específicos. Aunque los mecanismos y asociaciones mencionados

son notables, corresponden a una minoría de todos los casos de reactivación de la Tuberculosis ¹⁰. Esto sugiere que el modelo ampliamente aceptado de “debilitamiento” o decaimiento de la inmunidad para explicar la reactivación de la Tuberculosis requiere reconsideración.

Algunos mecanismos posibles que han sido propuestos para explicar la reactivación incluyen el agotamiento de las células T, expresión alterada de antígenos y alteraciones en el tráfico celular. El mantenimiento de la respuesta inmune efectiva en el sitio de infección requiere el reclutamiento continuo de células efectoras del sistema inmune, pero poco se conoce acerca de la cinética del recambio celular en el granuloma. Si es necesario mantener el tráfico hacia los granulomas por décadas para mantener la inmunidad local en la tuberculosis latente, es razonable pensar que defectos en el tráfico, incluso menores o intermitentes, podría permitir la reactivación de la Tuberculosis. Por otro lado, ha sido sugerido que la bacteria también podría tener un rol primario en algunos casos de reactivación que no pueden ser explicados por defectos inmunes o deficiencias ¹⁰. En conjunto, se conoce muy poco de los mecanismos que median la progresión desde la latencia a la reactivación.

Por último, la cuarta etapa es la transmisión a nuevos hospedadores que tiene lugar a través de aerosoles que son expulsados por un individuo con enfermedad activa e inhalados por un hospedador susceptible. En particular, los individuos con Tuberculosis cavitaria son especialmente contagiosos, ya que la conexión entre las cavidades y las vías aéreas facilita ampliamente la expectoración de la bacteria ¹⁰.

Inmunidad Innata frente a *Mycobacterium tuberculosis*

Como se mencionó, *M. tuberculosis* ingresa al hospedador a través de las vías aéreas. Una vez en los alvéolos pulmonares, los macrófagos alveolares residentes son el primer tipo celular involucrado en la fagocitosis de *M. tuberculosis*. Los alvéolos contienen una capa fina de células epiteliales de tipo I y de tipo II y otras células inmunes como los macrófagos alveolares, CD4 y neutrófilos. Hay pocos macrófagos alveolares por alvéolo (alrededor de 10) pero tienen una vida media de alrededor de 3 meses en humanos. Luego del encuentro con los macrófagos alveolares, las CD4, los macrófagos derivados de monocitos y los neutrófilos también forman parte del proceso fagocítico ¹¹.

La respuesta inmune innata se caracteriza por el reconocimiento de diversos patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs), por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Un gran número de receptores son críticos en el reconocimiento de *M.*

tuberculosis por los fagocitos (**Fig. 6**), incluyendo los receptores tipo Toll (TLR), receptores del complemento (CR), el receptor de manosa (MR), receptores de lectina tipo C, entre otros ^{11,12}.

El TLR2 es el TLR para el cual se han identificado el mayor número de agonistas micobacterianos, incluyendo lipoproteínas, fosfatidilinositol mananos y lipomananos. El TLR4 reconoce lípidos de la pared, glicoproteínas y proteínas secretadas. El TLR9 citoplasmático sensa ADN micobacteriano y contribuye con la producción de citoquinas por macrófagos y CDs. Dentro de la familia de receptores de lectina tipo C, los receptores DC-SIGN pueden reconocer LAM, dectina 1 aún tiene ligandos de *M. tuberculosis* sin caracterizar, el receptor de manosa reconoce LAM y ManLAM y mIncle media el reconocimiento de TDM; el glicolípido más abundante de la pared de la bacteria. Los receptores scavenger CD36, MARCO, SRA y AIM también participan del reconocimiento de *M. tuberculosis* mediante la interacción con ManLAM y otros componentes de la pared celular. Otros receptores de superficie como CD14 y el receptor del complemento 3 (CR3) también intervienen en el reconocimiento de *M. tuberculosis*. Ambos reconocen LAM y CR3 puede reconocer además una gran cantidad de productos micobacterianos ¹³. Los PRR citosólicos como NOD2 y NLRP3 reconocen los péptidoglicanos y algunas proteínas secretadas como ESAT6. AIM2 (proteína citoplasmática ausente en melanoma 2, por sus siglas en inglés) y STING también han sido propuestos como sensores de ADN micobacteriano. ¹³

Un amplio repertorio de lípidos, proteínas, lipoproteínas, carbohidratos y nucleótidos estimula los diferentes PRRs, individual o colectivamente, induciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias, quemoquinas y moléculas de adhesión que contribuyen a la movilización y activación tanto local como sistémica de las células inmunes. Sin embargo, la activación de estos receptores no siempre resulta beneficioso para el hospedador ya que *M. tuberculosis* ha logrado modular el microambiente celular utilizando algunos PRRs.

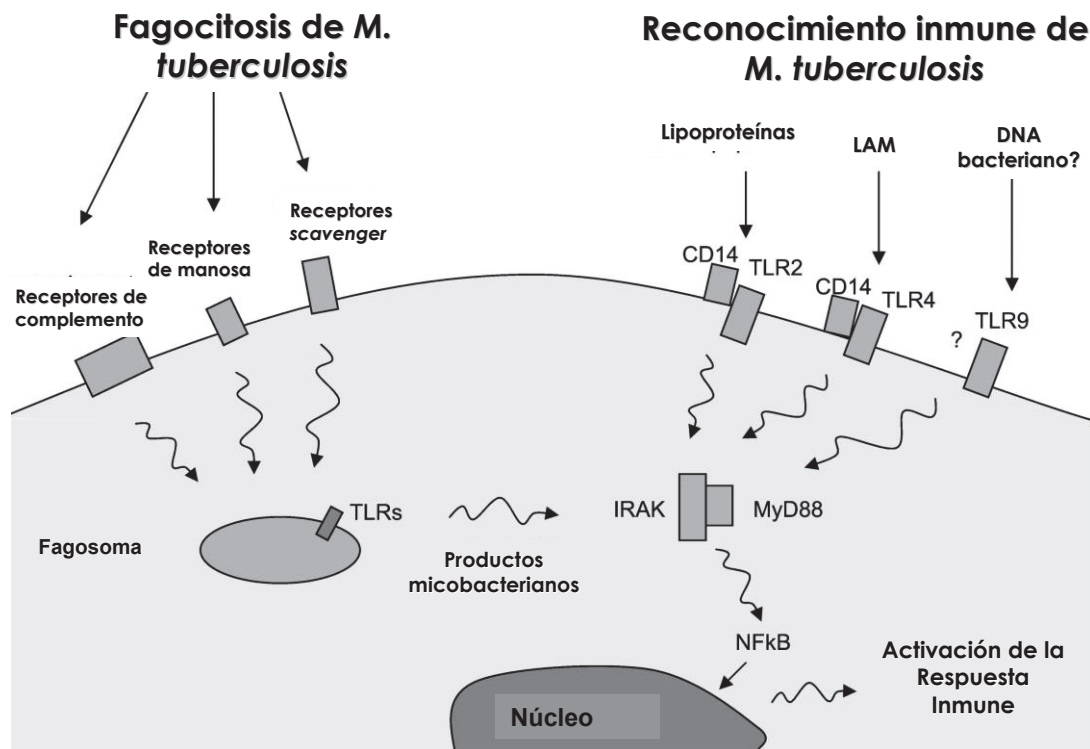


Fig. 6 Fagocitosis y reconocimiento de *M. tuberculosis*. Algunos de los receptores identificados para el reconocimiento de *M. tuberculosis* por macrófagos y CDs (los receptores del complemento, el receptor de manosa, receptores scavenger, el receptor DC-SIGN, el receptor de la proteína surfactante A, las lectinas de unión a manosa). Luego de la unión a los TLR, se activan las vías de señalización comunes que llevan a la producción de citoquinas. Los TLR se expresan no sólo en la superficie celular sino también en los fagosomas, por lo tanto, la activación inmune puede ocurrir en presencia o ausencia de fagocitosis (*Adaptado de Clin Microbiol Rev 15:294*).

El rol de las CDs es central para la presentación antigénica y la iniciación de la respuesta inmune adaptativa ¹⁴. Los neutrófilos son las primeras células que infiltran en los pulmones luego de la infección y son el tipo de célula más abundante que aparece en lavados broncoalveolares y esputo de pacientes con Tuberculosis pulmonar activa. Estas células juegan un papel muy complejo en la patología de la enfermedad. Su reclutamiento al pulmón y su rol patológico están regulados por varias citoquinas, quemoquinas, alarminas (como las proteínas S100A8 / A9) y miARN intrínsecamente expresados (como miR-223) ¹⁴. Ciertos factores liberados por los neutrófilos durante los estallidos respiratorios, como la elastasa, colagenasa y mieloperoxidasa, pueden dañar tanto células bacterianas como del hospedador indiscriminadamente. Por tanto, los neutrófilos constituyen una población de células efectoras que pueden mediar tanto la actividad antimicobacteriana como la inmunopatología de la infección ¹⁴. Las células asesinas naturales (Natural killer cells (NKs)) están también involucradas en la respuesta inmune innata frente a *M. tuberculosis*, poseen un rol central en la amplificación de las defensas antimicrobianas a través del reconocimiento de macrófagos infectados por sus receptores NKp44,

NKp46 y NKG2D. Las células NK pueden lisar los macrófagos infectados, producir IFN- γ promoviendo la activación de otros macrófagos y pueden, también, secretar citoquinas que expanden las poblaciones de células NKT y CD8¹⁴. Las células T $\gamma\delta$ también están presentes en los alvéolos, reconocen fosfoantígenos de *M. tuberculosis* y participan en la inducción de la muerte de macrófagos infectados a través de la producción de gránulos citotóxicos y en la producción de citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ y el TNF- α ¹⁵

La respuesta inmune innata es sin duda un estadio dinámico y posee un rol clave al establecer el ambiente que permite la generación de la respuesta T adaptativa necesaria para contener la enfermedad. Si bien provee las bases para la iniciación de la respuesta inmune celular adaptativa a través del reclutamiento y la inducción de la maduración de las CDs, los eventos iniciales de la respuesta inmune innata también pueden proveer nichos adicionales que favorecen el crecimiento de la bacteria. Por lo tanto, la comprensión de las variaciones en la respuesta inmune innata en los individuos con diferente resolución frente a la infección por *M. tuberculosis* proveerá de herramientas fundamentales para la elección de vectores y adyuvantes (inductores de la inmunidad innata) para el diseño óptimo de vacunas como así también inmunoterapias para la Tuberculosis.

Macrófagos. Heterogeneidad de poblaciones y mecanismos microbicidas

Los macrófagos derivan de células hematopoyéticas de la médula ósea, se diferencian a partir de células promonocíticas a monocitos maduros en la sangre periférica y en macrófagos luego de la migración al tejido donde mantienen la homeostasis o se reclutan en respuesta a un proceso inflamatorio o infeccioso. Su patrón de diferenciación depende en gran medida del entorno local, incluida la ubicación del tejido y células asociadas, así como de factores de crecimiento y citoquinas presentes en cada sitio. La heterogeneidad observada refleja la plasticidad y adaptación de estas células a diferentes ubicaciones anatómicas e inmunológicas. Para simplificar, la heterogeneidad de los macrófagos se ha categorizado en cuatro grupos principales definidos principalmente por condiciones de cultivo celular *in vitro*: macrófagos tipo I y tipo II, macrófagos activados alternativamente y macrófagos desactivados¹⁶.

Los macrófagos de tipo I (activación clásica o células M1) se diferencian por cultivo *in vitro* con IFN- γ y LPS. Los macrófagos de tipo II (activación innata) se diferencian en cultivo *in vitro* por activación de receptores mediada por complejos inmunes. Ambos fenotipos de macrófagos están asociados con una alta actividad microbicida, producción de citoquinas proinflamatorias como

TNF- α , IL-1 β e IL-6, generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), y la activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que conduce a la síntesis de óxido nítrico (NO). Los macrófagos de tipo I también muestran un aumento del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II y de la molécula CD86 y una mayor capacidad de presentar antígenos. Algunas diferencias entre los perfiles de tipo I y tipo II incluyen la disminución de la expresión del receptor de manosa (MR, CD206) en macrófagos tipo I, mientras que los macrófagos de tipo II tienen una mayor producción de la citoquina inmunorreguladora IL-10 y una disminución de la producción de la citoquina proinflamatoria IL-12. Por tanto, las dos poblaciones de macrófagos, aunque resultan fenotípicamente similares, tienen distintos perfiles funcionales ¹⁶.

El tercer grupo se compone de macrófagos activados alternativamente (o M2). Estas células resultan del cultivo *in vitro* con citoquinas de tipo Th2 como la IL-4 o IL-13, que disminuye la capacidad de respuesta celular al IFN- γ e inhibe la síntesis de iNOS. Los glucocorticoides también pueden dar lugar a la generación de macrófagos alternativos. Los macrófagos activados alternativamente tienen una mayor expresión de MR acompañada de una disminución en la expresión de CD14. Además, estas células no producen grandes cantidades de intermediarios oxidantes o citoquinas proinflamatorias, sino que secretan algunas citoquinas antiinflamatorias como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Esta población de macrófagos ha sido asociada con la reparación de tejidos y la inmunidad humoral ¹⁶.

Finalmente, el fenotipo de macrófagos desactivados es inducido por cultivo *in vitro* en presencia de citoquinas como IL-10 o TGF- β . Este fenotipo de macrófagos se ha asociado con producción de citoquinas antiinflamatorias, producción de prostaglandina E2 (PGE2) y expresión reducida de CMH II ¹⁶.

Recientemente ha surgido la idea de una clasificación más flexible, donde la heterogeneidad de los macrófagos generada en respuesta a procesos inmunes innatos o adquiridos se considera un espectro. Las poblaciones de macrófagos clásicos o alternativos que contribuyen a la cicatrización de heridas o que poseen funciones regulatorias, pueden superponerse en sus funciones, representando diferentes puntos a lo largo de un único espectro ¹⁶.

En cuanto a la infección causada por *M. tuberculosis*, son numerosos los factores que intervienen en el reconocimiento de la bacteria y en los procesos que conllevan a la contención del patógeno y al establecimiento o eliminación de la enfermedad. Como fue mencionado, los macrófagos juegan un rol fundamental ya que al estar presentes en los alvéolos pulmonares son los primeros en encontrar al patógeno, reconocerlo y fagocitarlo con el fin de eliminarlo; pero también pueden

convertirse en un nicho para el crecimiento de la bacteria. Los macrófagos alveolares, son esenciales en la homeostasis del tejido, el reconocimiento temprano de patógenos, la iniciación de la respuesta inmune local y la resolución de la inflamación. Son especialmente importantes en la defensa frente a la Tuberculosis gracias al proceso fagocítico que llevan a cabo, a su poder microbicida intracelular y a la capacidad de presentación antigénica a los linfocitos T. Aun cuando la infección se vuelve crónica o latente, los macrófagos siguen cumpliendo funciones efectoras esenciales. Sin embargo, los macrófagos en los alvéolos son el principal blanco de *M. tuberculosis* una vez que ingresa al pulmón ^{16,17}. La interacción de *M. tuberculosis* y de estas células, además del microambiente inicial, podría definir la progresión de la infección.

La migración de *M. tuberculosis* hacia afuera del sitio primario de infección ocurre a pesar de la generación de la respuesta granulomatosa y la bacteria utiliza las células del hospedador para mediar esta migración. El problema es que esto ocurre recién luego de 7-9 días de iniciada la infección. Como consecuencia, hay un retraso de 18-20 días antes de que las células T antígeno-específicas se acumulen en el pulmón en un número suficiente para frenar el crecimiento bacteriano ¹⁸.

Como se mencionó previamente, el reconocimiento de *M. tuberculosis* es mediado por múltiples receptores en los macrófagos, algunos de ellos no sólo reconocen al patógeno, sino que también inician su fagocitosis ¹¹. La lucha del hospedador frente al patógeno en la infección por *M. tuberculosis* implica varios niveles, incluyendo la contención de la bacteria, la generación de radicales libres, la creación de un ambiente hostil, ácido, deprivado de nutrientes esenciales, la producción de péptidos antimicrobianos y la secreción de citoquinas, el reclutamiento de otras células inmunes y las actividades suicidas de los macrófagos como la inducción de la apoptosis, autofagia y fagocitosis para prevenir la propagación de la enfermedad.

Así, diversos mecanismos son disparados una vez que los macrófagos reconocen e internalizan la bacteria. Los macrófagos son capaces de producir un amplio rango de citoquinas y quemoquinas induciendo la activación y migración de distintas células del sistema inmune, son células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales por lo que pueden presentar antígenos a través de CMH II a los linfocitos T y dar señales coestimuladoras y una de sus funciones principales es la de fagocitar y destruir células infectadas o microbianas. Después de la fagocitosis de *M. tuberculosis* se inicia la formación del fagolisosoma, que tiene como finalidad la muerte del microorganismo y la degradación de su contenido. Este proceso se realiza por la adquisición de enzimas lisosomales mediante un complejo proceso de maduración caracterizado por la fusión secuencial con endosomas y, finalmente, con lisosomas ¹⁶. Durante la biogénesis fagolisosomal

los eventos de fusión son controlados por un subtipo de GTPasas, las proteínas Rab, que incluyen Rab5 y Rab7, las cuales se encargan de regular la naturaleza de los eventos de fusión con endosomas tempranos y tardíos, respectivamente. Los fagosomas se fusionan con los endosomas y los lisosomas al tiempo que los componentes de la membrana se reciclan a la membrana plasmática. Durante el proceso de maduración fagosomal, la acidificación y los niveles de enzimas lisosomales como las hidrolasas ácidas, LAMP1, LAMP2 y catepsina D aumentan; mientras que los marcadores endocíticos como CD63, el receptor de transferrina y Rab5 disminuyen dentro del fagosoma¹⁹⁻²². De esta forma, una vez fagocitados, muy pocos microorganismos pueden sobrevivir dentro de los macrófagos debido a la abundancia de vacuolas fagocíticas ácidas y enzimas hidrolíticas que contienen hidrolasas lisosomales e intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno.

Los macrófagos también pueden eliminar otras células que hayan sido infectadas por *M. tuberculosis* y se encuentren en estado apoptótico mediante la eferocitosis (del griego: para llevar a la tumba). Luego de la fagocitosis, los cuerpos apoptóticos son entregados a los lisosomas y finalmente degradados en los endolisosomas. Otra vía promovida por la eferocitosis es la presentación antigénica cruzada, mediante la cual los macrófagos pueden alertar a los linfocitos T CD8+ para que ejecuten sus funciones citotóxicas²³. Además, las células apoptóticas son fuente de presentación antigénica para las CDs lo cual incrementa la activación de la respuesta inmune adaptativa²⁴.

La autofagia es otro mecanismo que ocurre en macrófagos y contribuye con la eliminación de *M. tuberculosis*. Este es un proceso altamente conservado que sirve para degradar proteínas u organelas enteras mediante la vía lisosomal. También puede funcionar como un mecanismo de supervivencia proveyendo a la célula de aminoácidos esenciales que le permiten continuar con su actividad metabólica. Resulta también importante para remover constituyentes celulares potencialmente dañinos como mitocondrias dañadas, proteínas mal plegadas o agregados proteicos. La autofagia da como resultado la captura de proteínas citoplasmáticas por medio de una doble membrana llamada autofagosoma, el cual se fusiona con los lisosomas para dar lugar al autolisosoma dentro del cual se degrada el material capturado. Los macrófagos pueden usar este mecanismo para atrapar parásitos y bacterias, incluyendo a *M. tuberculosis*. Otra manera mediante la cual la autofagia promueve la eliminación de *M. tuberculosis* es incrementando la presentación cruzada vía CMH I hacia los linfocitos TCD8+²⁵.

En la inmunidad mediada por los macrófagos frente a las micobacterias, las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) juegan un rol importante. Los fagocitos generan ROS

mediante las subunidades catalíticas de la enzima NADPH oxidasa 2 (NOX2) que comienza con la producción del anión superóxido. Estas subunidades (gp22phox, gp40phox, gp47phox, gp67phox y gp91phox) se expresan mayormente en neutrófilos y macrófagos. El anión superóxido puede combinarse y sintetizar oxidantes microbicidas como el hipoclorito y el peróxido de hidrogeno en los fagosomas de los macrófagos ²⁶. Además de este efecto directo, los ROS inducen la autofagia y la apoptosis en estas células y podrían actuar sinérgicamente con péptidos antimicrobianos para aumentar la muerte de las micobacterias. Sin embargo, por otra parte, el exceso de ROS mitocondriales puede inducir necrosis programada (necroptosis) y la consiguiente liberación de la bacteria al medio extracelular que resulta permisivo para su crecimiento ²⁷.

Los antígenos de *M. tuberculosis* son fuertes estímulos para los macrófagos y pueden dar lugar a la producción de citoquinas. Principalmente, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL-1 β cumplen un rol importante en la defensa frente a *M. tuberculosis*. TNF- α es secretado por macrófagos activados y contribuye con la activación de estos fagocitos, la formación del granuloma, la prevención de la diseminación de bacterias y la apoptosis de las células infectadas ²⁸. El TNF- α también es importante para inducir procesos como la maduración de las CDs, las respuestas de las células T específicas de antígeno y la migración de leucocitos ²⁹. La IL-1 β también se produce en la infección por *M. tuberculosis* humana principalmente por monocitos, macrófagos y CDs ³⁰. Cuando esta molécula efectora antimicrobiana es liberada por macrófagos ^{31,32} que se encuentran bajo glucólisis, limita la supervivencia bacteriana ^{30,33-35}. IL-1 β también promueve la secreción de TNF- α y la activación de la caspasa-3 pro apoptótica en macrófagos infectados, lo que contribuye a limitar el crecimiento bacteriano dentro de estos fagocitos ³⁶. Otras citoquinas también son relevantes durante la respuesta inmune antituberculosa. Los macrófagos (como así también las CDs) son importantes productores de IL-12p40, IL-12, IL-23 e IL-27. Estas citoquinas están asociadas en gran medida con la inducción y regulación de la expresión de citoquinas en células T ³⁰. Los macrófagos también pueden secretar TGF- β , cuyo impacto en la enfermedad se ha descrito como potencialmente negativo debido a su rol regulatorio y permisivo en cuanto al crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* ³⁰. La IL-10 también puede permitir el mantenimiento de un nicho replicativo para la bacteria y la supervivencia dentro del fagosoma. Adicionalmente, la IL-10 puede inhibir los efectos activadores del IFN- γ sobre los macrófagos ³⁰.

La función de los macrófagos es ampliamente regulada por un gran rango de moléculas que incluyen citoquinas, quemoquinas y diferentes receptores. Resulta imprescindible delinear las vías de señalización y mecanismos que llevan a la activación de los macrófagos como así también

de los procesos que favorecen la fagocitosis y la eliminación de la bacteria de manera de enfocarnos en nuevas estrategias terapéuticas para la Tuberculosis.

Macrófagos. Mecanismos de evasión desarrollados por *M. tuberculosis*

A lo largo de los años, *M. tuberculosis* ha desarrollado diversas estrategias para asegurar su entrada a los fagocitos, engañar y evadir la respuesta celular potencialmente tóxica del hospedador. Así, este patógeno es capaz de modular las funciones efectoras en la respuesta inmune celular durante y después de su entrada al fagocito. A pesar de la basta maquinaria de defensa que poseen los macrófagos, *M. tuberculosis* puede interferir con numerosos mecanismos microbicidas en diferentes etapas o estadios. Al no poseer un reservorio natural fuera de los humanos, su habilidad para sobrevivir dentro de los macrófagos constituye la clave de la persistencia y patogénesis de *M. tuberculosis*.

Las características estructurales de *M. tuberculosis* ayudan a inhibir la maduración y acidificación del fagolisosoma. Por ejemplo, puede frenar la formación del lisosoma induciendo un aumento de la expresión de coronina 1 (o TACO, por sus siglas en inglés para proteína de envoltura que contiene triptófano y aspartato) en la membrana de los fagosomas^{24,37}. Esta proteína está involucrada en la formación de fagosomas tempranos por lo que su retención o aumento en la membrana permite que *M. tuberculosis* permanezca en un compartimento que ha detenido su maduración. También puede frenar la maduración de los fagosomas modulando la función de la GTPasa Rab5 que es necesaria durante las etapas tempranas, pero no tardías, de formación del fagolisosoma. Rab5 puede ser retenida en membrana³⁷, como así también *M. tuberculosis* puede bloquear su función³⁸ o promover su disociación del fagosoma para evitar que se sucedan las etapas madurativas posteriores³⁹. Esto también conduce a inhibir el reclutamiento de EEA1 (por sus siglas en inglés para autoantígeno 1 de endosoma temprano). Esta molécula está implicada en la fusión endosoma-endosoma, por lo cual su ausencia no permite la maduración del fagolisosoma. Los fosfoinosítidos y ManLAM de *M. tuberculosis* se ven implicados en la modulación de EEA1^{20,21,37}. Asimismo, la acidificación del fagolisosoma puede verse comprometida y la bacteria logra sobrevivir en un ambiente menos ácido (pH \approx 6.2)²⁴.

M. tuberculosis también ha logrado evadir la autofagia impidiendo la fusión autofagosoma-lisosoma. En este sentido, se han descrito tanto proteínas^{40,41} como microARNs^{24,42} bacterianos capaces de inducir este mecanismo de escape. Más aun, la apoptosis puede verse inhibida mientras que la necrosis es promovida lo cual impacta ampliamente sobre la respuesta inmune protectora del hospedador. Se ha reportado que ciertos miRNAs, componentes estructurales y

proteínas secretorias de *M. tuberculosis* pueden regular la apoptosis de los macrófagos ²⁴. Las cepas menos virulentas suelen ser inductoras del proceso apoptótico mientras que las más virulentas lo inhiben modulando la producción de NO, citoquinas proinflamatorias y la activación de caspasas ²⁴.

El estrés oxidativo es otros de los targets de *M. tuberculosis*. El micotiol (MSH) de este patógeno posee actividad antioxidante y ayuda a la bacteria a permanecer dentro de los macrófagos ²⁴. Las proteínas Wag31 y EIS también protegen a la bacteria del estrés oxidativo ^{24,43} como así también la fosfolipasa D que bloquea la acción de los ROS ²⁴ y las enzimas KatG y TrxB2 de *M. tuberculosis* que contribuyen a la resistencia en ambientes oxidativos ⁴⁴. Las proteínas CFP-10 y ESAT-6, juntas o separadas, pueden inhibir los radicales libres del oxígeno ²⁴. Mientras que la GGC (gamma glutamil-cisteina) está involucrada en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, la proteína Lsr2, con características similares a las histonas, protege a *M. tuberculosis* solamente de la acción de los ROS. Más aun, numerosas moléculas bacterianas pueden mediar la evasión de los intermediarios reactivos del nitrógeno. Es el caso de *noxR1* y *noxR2*, AhpC, Lpd y SucB ³⁷.

Otros mecanismos que ayudan a *M. tuberculosis* a escapar del sistema inmune incluyen mutación antigénica que altera el reconocimiento por parte de las células del hospedador para evitar la muerte ²⁴, inhibición del procesamiento y presentación antigénica vía CMH II ³⁷, aumento de la expresión del receptor PPAR- γ que da como resultado un aumento en la formación lípidos y una regulación negativa de la actividad microbicida del macrófago ²⁴, resistencia a la acción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β ²⁴ e IFN- γ ³⁷. Algunas de las principales estrategias de evasión exploradas por *M. tuberculosis* en los fagocitos se resumen en la **Fig. 7** ⁴⁵.

Los mecanismos de evasión inducidos por *M. tuberculosis* contribuyen a promover la persistencia del patógeno. Contrarrestar estos mecanismos que generan un nicho protector para la replicación bacteriana y se oponen al efecto antimicrobiano generado por los macrófagos resulta fundamental para establecer nuevas terapias. Las moléculas que median tales estrategias son objetivos potenciales para el desarrollo de nuevos agentes preventivos y terapéuticos contra la Tuberculosis.

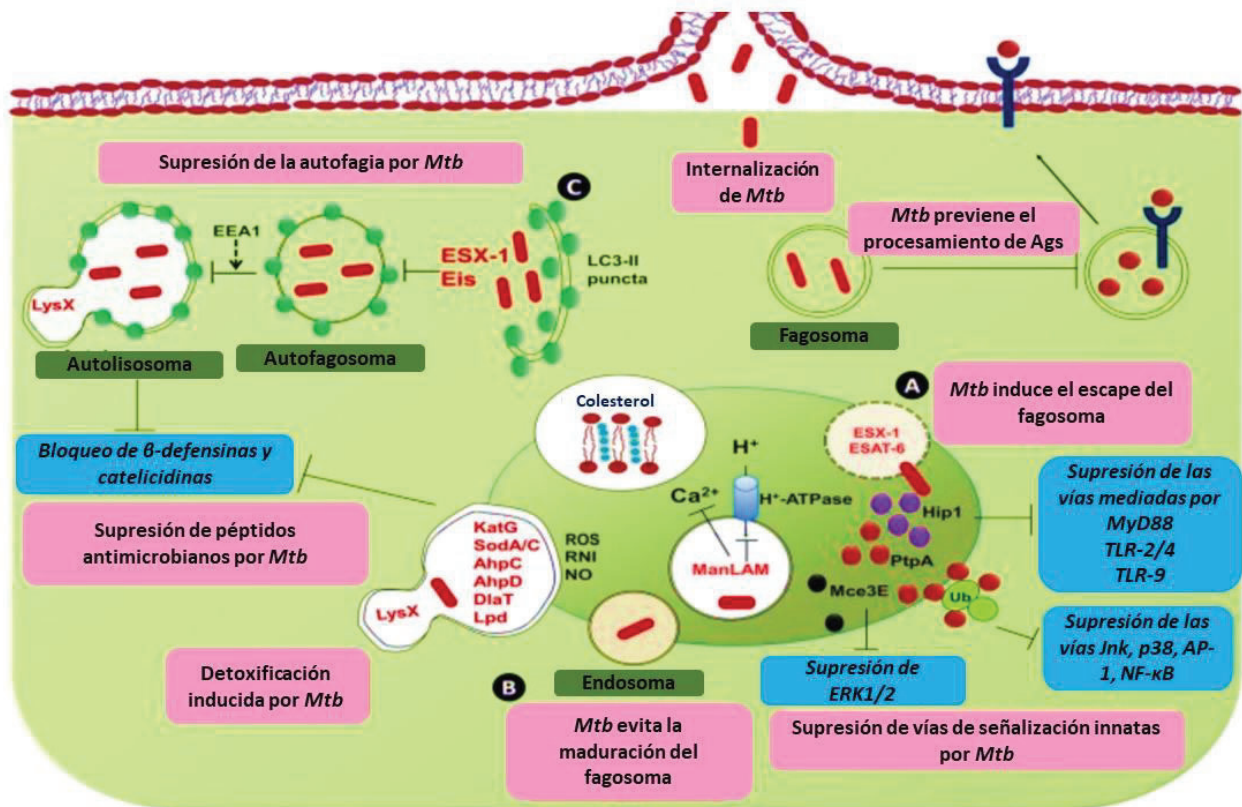


Fig. 7. Estrategias de evasión intracelular adoptadas por *M. tuberculosis* (*Mtb*) y mecanismos de defensa celular. La fagocitosis de *Mtb* es promovida por diversos receptores de superficie celular y el colesterol presentes en las células fagocíticas mononucleares. *Mtb* utiliza el colesterol del hospedador para su supervivencia e impide el procesamiento y la presentación de antígenos por sus lipoproteínas. En consecuencia, ESAT-6 y ESX-1 de *Mtb* alteran el proceso de maduración del fagosoma. Los factores de virulencia como PtpA y Mce3E de *Mtb*, finalmente restringen varias cascadas de señalización de la inmunidad innata al unirse con la ubiquitina del hospedador. ManLAM de *Mtb* detiene la maduración fagosomal interrumpiendo el transporte de H⁺ por la ATPasa a los fagosomas del hospedador y bloqueando la liberación de Ca²⁺ citosólico. Las enzimas KatG, SodA/C, peroxidasa dependiente de NADH, superóxido dismutasa y AhpC, AhpD, subunidad C/D de alquil hidroperóxido reductasa; DiaT de *Mtb* están involucradas en la detoxificación de ROS y RNI. La neutralización de péptidos antimicrobianos se logra mediante la proteína micobacteriana LysX. La supresión de la autofagia es lograda por el gen de "supervivencia intracelular mejorada (Eis)" de *Mtb*. **A.** Agonistas de PRRs como TLR-2, -4 y 9, NLRs NOD-1 y NOD-2 y CLR's Mincle, Dectin-1 y Dectin-2 inducen la maduración del fagosoma e inhiben el crecimiento de *Mtb*. **B, C.** Luego se desencadena la fusión de fagolisosomas y posterior proceso de autofagia. Hip1, proteína 1 que interactúa con la huntingtina; PtpA, proteína tirosina fosfatasa A; Mce3E, operón de entrada de células de mamífero 3E; ManLAM, manosa lipoarabinomanano; EEA1, antígeno 1 del endosoma temprano; ESAT-6, diana antigénica de secreción temprana de 6 kDa; ESX-1, sistema de secreción ESTAT6 I; LysX, proteína bifuncional de biosíntesis de lisilfosfatidilglicerol; KatG, catalasa-peroxidasa; SodA/C, superóxido dismutasa A/C; AhpC/D, subunidad C/D de alquil hidroperóxido reductasa; DiaT, dihidrolipoamida aciltransferasa; Lpd, lipoamida deshidrogenasa; Ags, antígenos; Ub, ubiquitina; Jnk, quinasa N-terminal c-Jun; AP-1, proteína activadora 1; NF-κB, factor nuclear-κB; ERK1/2, proteína quinasa 1 y 2 reguladas por señales extracelulares; LC3, proteína 1A/1B-cadena ligera 3 asociada a microtúbulos; ROS, especies reactivas de oxígeno; RNI, intermedios de nitrógeno reactivo; NO, óxido nítrico. (Adaptado de *Front. Immunol.* 9:193).

Moléculas coestimulatorias

Las moléculas coestimulatorias emiten señales positivas o negativas que activan o inhiben la función de la célula T y constituyen la segunda señal luego de la interacción del TCR con el

antígeno presentado en el contexto del CMH. Esta segunda señal provista por la interacción de moléculas coestimuladoras expresadas sobre la CPA, con sus ligandos específicos localizados sobre las células T es fundamental para la correcta activación de las células T. La polarización hacia los distintos linajes Th requiere además de la presencia de citoquinas provista por un tercer tipo celular ⁴⁶.

Las moléculas coestimuladoras CD28 y CTLA-4 (Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos, o CD152) son los principales reguladores en la activación temprana de linfocitos T vírgenes. La interacción de CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) sobre las CPA con los receptores CD28 y CTLA-4 sobre las células T da como resultado eventos de señalización que regulan las respuestas inmunes, incluyendo la proliferación celular y el balance entre respuestas Th1 y Th2. La coestimulación de células T a través de CD28 es importante para la generación de respuestas inmunes antígeno-específicas, ya que dicha interacción incrementa la diferenciación hacia célula T efectora luego de la estimulación antigénica, la expansión clonal, la magnitud y la duración de las respuestas T.

La coestimulación B7/CD28 resulta crítica para que el hospedador controle la infección crónica por *M. tuberculosis*. Ratones deficientes para CD80 y CD86 son capaces de contener la carga bacteriana inicialmente en el pulmón, pero exhiben una susceptibilidad aumentada durante la infección crónica, sugiriendo que esta coestimulación es crítica para la contención en el largo plazo dentro del granuloma ⁴⁷.

Luego de que los linfocitos T han sido activados y comienza la expansión clonal, otros miembros de la familia B7 y sus receptores (ICOS-B7h; PD-1-PD-Ls) contribuyen a la diferenciación/función de los linfocitos T activados. Previamente hemos demostrado que varias moléculas coestimuladoras regulan la activación y las funciones efectoras de las células T en pacientes con Tuberculosis. SLAMF1, ICOS y 4-1BB (CD137) inducen respuestas Th1 ⁴⁸⁻⁵². SLAMF1 e ICOS son capaces de inducir la producción de IFN- γ y de IL-17 por células Th1/Th17, mientras que PD-1 y CD31 actúan como reguladores negativos de la respuesta T durante la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* ^{53,54}.

Sin embargo, si bien la mayoría de los estudios se centran en el rol de las moléculas coestimuladoras como reguladoras claves de la respuesta T, estas moléculas son capaces de dar señales bi-direcciones impactando también sobre la función de las CPA.

Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAMF1)

Se denomina SLAM a una familia de receptores que poseen un importante rol en la inmunidad y cuya expresión se encuentra restringida a células hematopoyéticas. Esta familia está compuesta por un grupo de receptores transmembrana de tipo I que incluye a SLAMF1 (CD150 o SLAM), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (Ly-9 o CD229), SLAMF4 (2B4 o CD244), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (Ly108 en ratón o NTB-A en humanos), SLAMF7 (CRACC, CD319 o CS1), SLAMF8 (BLAME) y SLAMF9 (SF2001 o CD84H) (**Fig. 8**). Aunque SLAMF2, SLAMF8 y SLAMF9 están estrechamente relacionados a los receptores SLAM, estrictamente no se engloban dentro de esta familia al no compartir homología de su dominio citoplasmático. Sin embargo, los 9 miembros pertenecen a la superfamilia de la inmunoglobulinas CD2^{55,56}. Estos receptores poseen una fracción extracelular compuesta por dos segmentos tipo Inmunoglobulinas (Ig) (una región tipo variable (V) y una tipo constante 2 (C2)), una región transmembrana y una región intracelular (que contiene varios residuos tirosina fosforilables). A excepción de SLAMF4 que interacciona con SLAMF2, la familia de receptores SLAM son homoligandos. Por lo tanto, dependiendo del miembro de la familia involucrado, pueden activarse en el contexto de interacciones celulares homotípicas o heterotípicas (**Fig. 8**). Estos receptores se expresan ampliamente en las células inmunes mientras que no se encuentran en las células no inmunológicas. La mayoría de los tipos celulares inmunitarios expresan entre 3 y 5 miembros diferentes de la familia SLAM⁵⁶.

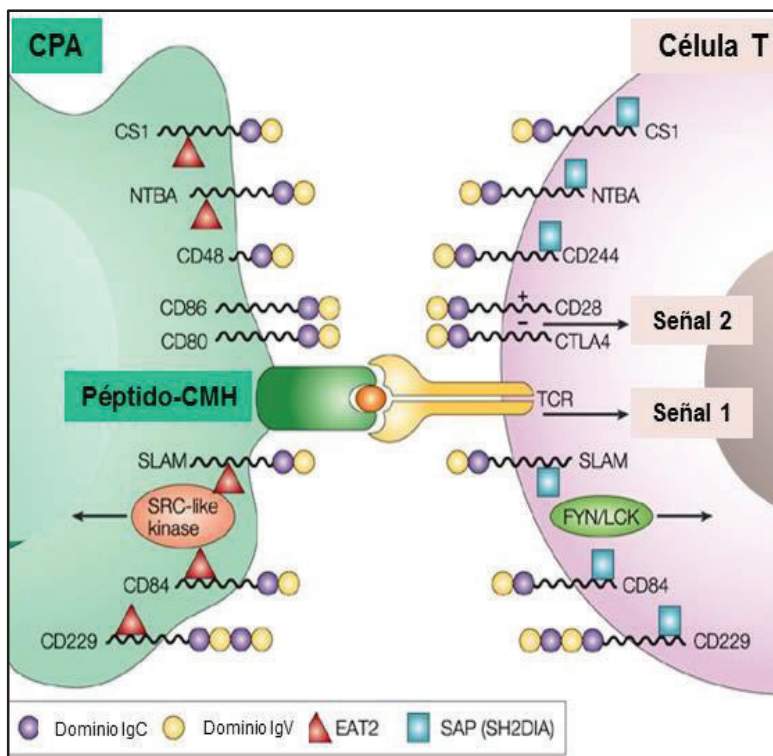


Fig. 8. Modelo de interacción entre miembros de la familia SLAM. Receptores de la familia de SLAM y sus respectivos ligandos durante la presentación antigénica. SLAMF1 (SLAM), SLAMF5 (CD84) y SLAMF7 (CS1) se unen de forma homotípica, mientras que SAMF4 (2B4) se une a SLAMF2 (CD48) así como a CD2, aunque con menor afinidad. La unión de los receptores de la familia de SLAM con sus ligandos conduce a la fosforilación de su extremo citoplasmático, permitiendo la unión de SAP (en linfocitos T) y EAT-2 (en la célula presentadora de antígenos) mediante sus dominios SH2. Estas moléculas reclutan quinasas Src, incluida Fyn que modulan la activación T. La unión a SLAM de diferentes proteínas con dominios SH2 da lugar a diferentes señales que determinan desenlaces biológicos distintos y usualmente opuestos. (*Adaptado de Nature Reviews Immunology. 3, 813-21 (2003)*).

Los receptores de la familia de SLAM no sólo operan como moléculas coestimuladoras sino que también participan en la hematopoyesis de las células NK, así como en la regulación funcional de células NK, neutrófilos, CD8, macrófagos y plaquetas.

La proteína de unión a SLAMF1 (SAP) se expresa en células T y NK y en algunas células B ⁵⁶. SAP puede interactuar a través de su dominio SH2 con los miembros de la familia de receptores de SLAM ⁵⁶. El descubrimiento de que el gen codificante para SAP se encuentra mutado en el Síndrome Linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP, por sus siglas en inglés) fue el primer indicativo de que la familia de receptores SLAM estaban implicados en la inmunopatogénesis de enfermedades humanas ^{56,57}.

En particular, SLAMF1 humano es una proteína de membrana de tipo I que cuenta con ocho sitios potenciales de N-glicosilación, con un dominio V y un dominio C2 ⁵⁸. La expresión de SLAMF1 ha sido reportada en células T activadas, células B, CD8, macrófagos, plaquetas y células Tfh del centro germinal ⁵⁹. Asimismo, se encuentra expresado en clones Th1 y Th2, linfocitos inmaduros y monocitos activados. SLAMF1 también se expresa en una población de linfocitos B periféricos, y su expresión aumenta luego de su activación ⁵⁵. La estimulación a través de SLAMF1 utilizando un anticuerpo agonista (A12) induce perfiles de citoquinas Th1/Th0 en células T activadas por antígeno, incluso en clones Th2, sugiriendo así que esta molécula tendría una función en los mecanismos que determinan las respuestas Th1 versus Th2 ⁶⁰. Ha sido reportado un incremento en la respuesta proliferativa antígeno-específica en células T de individuos sanos inmunizados con derivado proteico purificado o toxoide tetánico luego de la coestimulación a través de SLAMF1. Más aún, ha sido descrito que, durante la infección por el VIH, existe una alteración de la expresión de SLAMF1 ⁶¹. Trabajos más recientes muestran que la expresión de SLAMF1 es mayor en células Th1 que en las Th2 ⁶², lo que indica que la vía de señales inducida por SLAMF1 posee un rol importante en la inmunidad frente a patógenos intracelulares. En la infección activa por *M. tuberculosis*, resultados previos demuestran que la coestimulación a través de SLAMF1 induce la producción de IFN- γ por las células T ⁴⁸, a través de una cascada de señalización que involucra la fosforilación de la proteína quinasa Erk y del factor de transcripción CREB ^{50,63}. Esta vía de señalización es aberrante en pacientes que presentan mayor severidad de la enfermedad ^{50,63}.

Sin embargo, el rol de SLAMF1 en la producción de citoquinas por CPA ha demostrado ser controversial. Por un lado ha sido demostrado que induce la producción de IL-12 y CXCL8 por parte de CD8 estimuladas con LPS ⁶⁴, mientras que un trabajo posterior mostró que las interacciones SLAMF1 / SLAMF1 entre CD8 activadas por CD40L regulan negativamente la producción de IL-12, IL-6 y TNF- α ⁶⁵. En ratones, la activación de SLAMF1 induce la producción de

NO, IL-12 y TNF- α mientras que disminuye la secreción de IL-6 en macrófagos estimulados con LPS e IFN- γ ⁶⁶.

SLAMF1 actúa como un regulador vital en la defensa inmune innata contra las bacterias Gram negativas en los macrófagos, regulando dos procesos bactericidas principales: la maduración del fagosoma y la producción de ROS por el complejo de la NADPH oxidasa (NOX2) ⁶⁷. Es así que SLAMF1 promueve la maduración del fagolisosoma en macrófagos murinos estimulados con *Escherichia coli* y promueve la eliminación de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* tanto *in vitro* como *in vivo* en estas células ⁶⁷. SLAMF1 también es una molécula clave en la patogenicidad causada por *Tripanozoma cruzi* durante la fase aguda en ratones ⁶⁸. SLAMF1 es necesario para la interacción y la internalización de ciertas cepas de *T. cruzi* por parte de los macrófagos murinos, lo cual afecta la producción de ROS y promueve la supervivencia de los parásitos ⁶⁹.

Más aún, existen fuertes evidencias de que algunos receptores de la familia de SLAM también pueden actuar como receptores de entrada para patógenos. De esta manera, pueden comportarse de manera promiscua reconociendo diferentes ligandos con distintos niveles de afinidad. SLAMF1 actúa como receptor de internalización del virus del sarampión ⁷⁰ en humanos mediante la interacción con la hemaglutinina, como así también de morbilivirus ⁷¹ en otras especies. Recientemente también se ha propuesto la interacción entre SLAMF1 y *T. cruzi* ⁶⁹. Más aún, ha sido reportado que SLAMF1 y SLAMF6 pueden unirse y permitir la entrada de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* ^{67,72} y *Citrobacter Rodentium* ⁷² a los macrófagos de mamíferos. Particularmente, ha sido demostrado que SLAMF1 es capaz de reconocer proteínas de membrana externa de *E. coli* (OmpC y OmpF) ⁶⁷, *Brucella abortus* (Omp25) ⁷³ y *S. typhimurium* ⁶⁷.

Sin embargo, el papel de SLAMF1 en las funciones de los macrófagos humanos durante la infección por *M. tuberculosis* ha sido poco explorado. Los enfoques de microarrays han mostrado niveles aumentados de ARNm de SLAMF1 en macrófagos humanos estimulados con diferentes bacterias, incluyendo BCG y la cepa Erdman de *M. tuberculosis* ⁷⁴ y en macrófagos alveolares humanos infectados con las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis* ⁷⁵. Sin embargo, ambos estudios se centran en perfiles de expresión sin abordar el impacto funcional de las interacciones de SLAMF1 en el contexto de la Tuberculosis. Finalmente, Song y col. han demostrado que la regulación positiva de SLAMF1 promueve el clearance bacteriano en la línea celular macrofágica murina RAW264.7 infectada con BCG y en el pulmón de ratones infectados con esta bacteria ⁷⁶.

Una mejor comprensión de la interacción *M. tuberculosis* -macrófago podría contribuir a delinear nuevas estrategias que lleven a una eliminación más eficiente de la bacteria y a una mejor y más rápida migración de células T efectoras al pulmón que puedan reconocer y eliminar los macrófagos infectados, además de secretar mediadores como IFN- γ y TNF- α que contribuyen en la generación de la respuesta protectora frente a *M. tuberculosis*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y que las micobacterias producen proteínas formadoras de canales identificadas como Omp nos propusimos explorar el papel de SLAMF1 en macrófagos humanos en la respuesta inmune innata frente a *M. tuberculosis*. Abordamos su rol como molécula coestimuladora, así como también su rol como sensor potencial para *M. tuberculosis* en macrófagos humanos.

Objetivos



Objetivo General

El objetivo general de este capítulo es investigar los mecanismos involucrados en la activación y modulación de la función de los macrófagos durante la infección por micobacterias. La fagocitosis de los microorganismos es un proceso que intenta limitar o resolver las infecciones. Comprender cómo los macrófagos eliminan los patógenos podría ofrecer importantes conocimientos para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. En el presente trabajo proponemos explorar el rol de la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAMF1) en la activación y función de los macrófagos en la infección producida por *M. tuberculosis*. *La inducción del potencial microbicida de los macrófagos podría contribuir a la resolución de esta infección, inducir la migración más eficiente de células de la respuesta inmune adaptativa y limitar el daño producido por la fuerte respuesta proinflamatoria.*

Objetivos específicos

Objetivo 1- Caracterizar el perfil de expresión de SLAMF1 en la línea celular monocítica-macrofágica THP-1 y en macrófagos derivados de monocitos humanos luego de estimulación *in vitro* con *M. tuberculosis* y distintas citoquinas.

Objetivo 2- Determinar la expresión de SLAMF1 en células de sangre periférica y de derrames pleurales de pacientes con Tuberculosis activa.

Objetivo 3- Investigar el rol de SLAMF1 en la activación y fagocitosis de los macrófagos estimulados con *M. tuberculosis*.

3.1- Evaluar la expresión de marcadores de activación de los macrófagos.

3.2- Evaluar la viabilidad celular luego del tratamiento con un anticuerpo agonista para SLAMF1.

3.3-Evaluar la secreción de citoquinas proinflamatorias.

3.4-Evaluar la internalización de cepas de *M. tuberculosis* vivas e inactivadas en respuesta a la activación de SLAMF1 con un anticuerpo agonista en células THP-1 y macrófagos derivados de monocitos.

Objetivo 4- Determinar la existencia de interacción bioquímica entre SLAMF1 y *M. tuberculosis*.

Objetivo 5- Investigar la participación de SLAMF1 en la maduración del fagolisosoma frente a la infección por *M. tuberculosis*. Evaluar para esto la colocalización de SLAMF1 con marcadores de maduración del fagolisosoma (EEA1, CD107b).

Materiales y Métodos

Muestras humanas

Dadores sanos. Los monocitos humanos se obtuvieron a partir de muestras de sangre periférica de donantes sanos (DS) adultos. Luego fueron diferenciados a macrófagos. La distribución del grupo masculino/femenino fue 13/6 y la mediana de la edad de 32 años; rango intercuartil (IQR) 18-75 años.

Pacientes con Tuberculosis. Las muestras de derrame pleural (DP) y sangre periférica pareada (SP) fueron recolectadas de pacientes VIH negativos con pleuresía tuberculosa después de realizarse procedimientos estándares con fines de diagnóstico en el Hospital de Infecciosas "Dr. Francisco Javier Muñiz", Buenos Aires, Argentina. El diagnóstico de pleuresía tuberculosa se basó en un resultado positivo para la tinción de Ziehl-Nielsen o cultivo Lowestein-Jensen de DP y / o por histopatología de la biopsia pleural, y fue confirmado por respuesta de IFN- γ inducida por *M. tuberculosis* y un test de adenosina deaminasa (ADA) positivo ⁷⁷. Ninguno de los pacientes presentó Tuberculosis con multirresistencia a drogas o había recibido tratamiento antituberculoso antes de la colección de la muestra. La distribución del grupo masculino/femenino fue 6/2 y la edad media fue de 39 años; IQR 18–75 años.

La investigación se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (2013) promulgada por la Asociación Médica Mundial y aprobada por los Comités de Ética del Hospital "Francisco J. Muñiz", la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Argentina (número de protocolo: NIN-2612-17) y UNNOBA (COENOBA). Se obtuvieron consentimientos informados por escrito de todos los participantes antes de la recolección de la muestra.

Antígenos y cepas bacterianas

La estimulación *in vitro* de las células se realizó con un lisado celular de la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis*, preparada mediante sonicación (BEI Resources, NIAID, NIH: *M. tuberculosis*, cepa H37Rv, Strain H37Rv, Whole Cell Lysate, NR-14822) o células completas de *M. tuberculosis* (BEI Resources, NIAID, NIH: *M. tuberculosis*, cepa H37Rv, Gamma-Irradiated Whole Cells NR-14819). Para algunos experimentos, el lisado celular (Mtb) fue teñido con rodamina (5 (6) - carboxitetrametilrodamina Nsuccinimidilo éster, cat. No. 21955, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en agitación durante 40 minutos (Rodamina-Mtb Ags). El exceso de rodamina fue eliminado mediante lavados con PBS 1X. Finalmente, el lisado se resuspendió en PBS 1X y se utilizó para estimular las células.

Para experimentos de infección con bacteria viva, la cepa de *M. tuberculosis* CDC 1551 que expresa proteína roja fluorescente (RFP) (*M. tuberculosis*-RFP) fue proporcionada amablemente por la Dra. Fabiana Bigi (INTA, Castelar, Argentina).

Cultivo celular

Todos los experimentos se llevaron a cabo en una incubadora a 37 ° C y en una atmósfera con 5% de CO₂.

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de dadores sanos y pacientes con Tuberculosis y las células mononucleares de los fluidos pleurales se aislaron por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.).

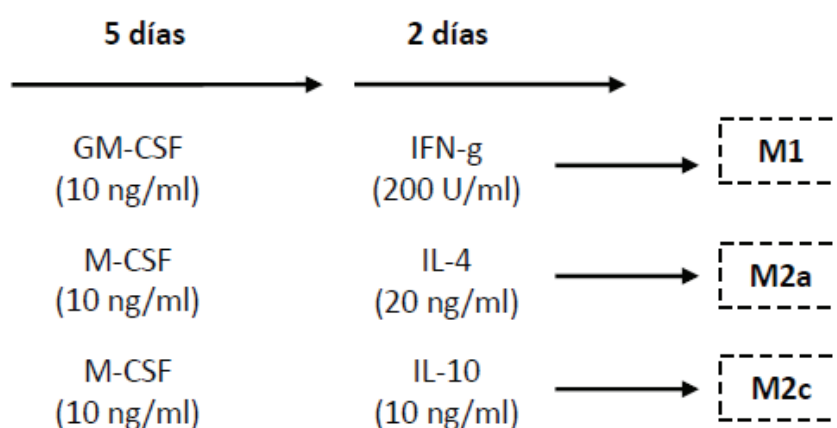
Para obtener macrófagos derivados de monocitos, los monocitos se purificaron a partir de CMSP de dadores sanos mediante selección magnética positiva por CD14 (Miltenyi Biotec, Cat No. 130-097-052), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los casos, la pureza de las células aisladas fue superior al 95%. Se cultivaron 0,5 x 10⁶ monocitos CD14 positivos por ml de medio de cultivo durante 2 horas en ausencia de suero bovino fetal (SBF) para promover la adherencia. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavados con RPMI precalentado y las células adherentes se cultivaron durante 16-18 horas adicionales en medio completo (medio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con L-glutamina (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), SBF al 10% (Gibco), 100 U / ml de penicilina y 100 µg / ml de estreptomina (Gibco)).

Las células THP-1 (ATCC® TIB-202™) se diferenciaron con 10 ng/ml de PMA (Sigma-Aldrich) durante 24 horas en medio completo (medio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con L -glutamina (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), SBF 10% (Gibco), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco), 0,25 g/L de glucosa (Gibco), 1 mM de piruvato de sodio (Gibco) y 5 mM de β-mercaptoetanol (Gibco)) para promover la adherencia. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavados con RPMI.

Las células THP-1 diferenciadas con PMA y los macrófagos derivados de monocitos se estimularon con 10 µl del sonicado de Mtb cada 1 x 10⁶ células (10 µl sonicado= 1 x 10⁶ bacterias) durante 4 o 24 horas en presencia o ausencia de 10 µg/ml de un anticuerpo agonista anti-SLAMF1 (clon A12, BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.), 10 ng/ml de rh-IFN-γ (Cat No. 11343534, Immunotools, Friesoythe, Alemania), 20 ng/ml de rh-IL-4 (Cat No. 11340042, Immunotools, Friesoythe,

Alemania) o 10 ng/ml de rh-IL-10 (Cat No. 200-10, PreprotTech, Nueva Jersey, EE. UU.). Para algunos experimentos, las células fueron estimuladas con 10 μ l de Rodamina-Mtb Ags o 10 μ l de células enteras de *M. tuberculosis* (WCMtb) (10 μ l = 1 x 10⁶ bacterias) por cada 1 x 10⁶ células durante 24 horas.

En ciertos experimentos, los macrófagos obtenidos luego del cultivo en RPMI por 2 horas fueron cultivados en presencia de diferentes citoquinas y factores de crecimiento para polarizarlos tanto al perfil clásico (M1) como a perfiles alternativos (M2a y M2c), como se detalla en el esquema.



Infeción con *M. tuberculosis*

Las infecciones con bacterias vivas se realizaron en laboratorio en la Unidad Operativa Centro de Contención Biológica, ANLIS-MALBRAN (Buenos Aires, Argentina) con nivel de bioseguridad 3, de acuerdo a guías institucionales de bioseguridad.

Células THP-1 diferenciadas con PMA se infectaron con *M. tuberculosis*-RFP (multiplicidad de infección [MOI] 5: 1) en presencia o ausencia de 10 μ g/ml de anticuerpo agonista anti-SLAMF1 (clon A12, BioLegend) durante 2 horas 37 °C. Luego, se eliminaron las bacterias extracelulares suavemente lavando con PBS 1X precalentado y las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con SBF al 10% y gentamicina (50 μ g/ml) con o sin anti-SLAMF1 durante 22 horas adicionales.

Citometría de Flujo

Las células THP-1 y los macrófagos derivados de monocitos se recogieron mediante lavado exhaustivo con buffer FACS (PBS 1X - SBF 2%) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. Luego, las células se tiñeron con anticuerpos anti-SLAMF1 conjugados a fluorocromos (anti-SLAMF1 PE, Cat No. 306308, BioLegend o anti-SLAMF1 Alexa Fluor 488 Cat No. 306312,

BioLegend). En paralelo con todos los experimentos, las muestras se incubaron con anticuerpos monoclonales irrelevantes (controles de isotipo). Todas las muestras se tiñeron con un colorante de viabilidad (Fixable Viability Dye eFluor™ 780 Cat No. 65-0865, eBioscience™) para excluir las células muertas del análisis. La estrategia de selección de las células SLAMF1 positivas se muestra en la **Fig. 1**. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) y el análisis de datos se realizó usando FlowJo 7.6.2 (Tree Star Inc., OR, EE. UU.).

Las células mononucleares de derrames pleurales (PE) y sangre periférica de pacientes con Tuberculosis se tiñeron con anticuerpos anti-CD14 PerCP Cy5.5 (BioLegend) y anti-SLAMF1 PE y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences).

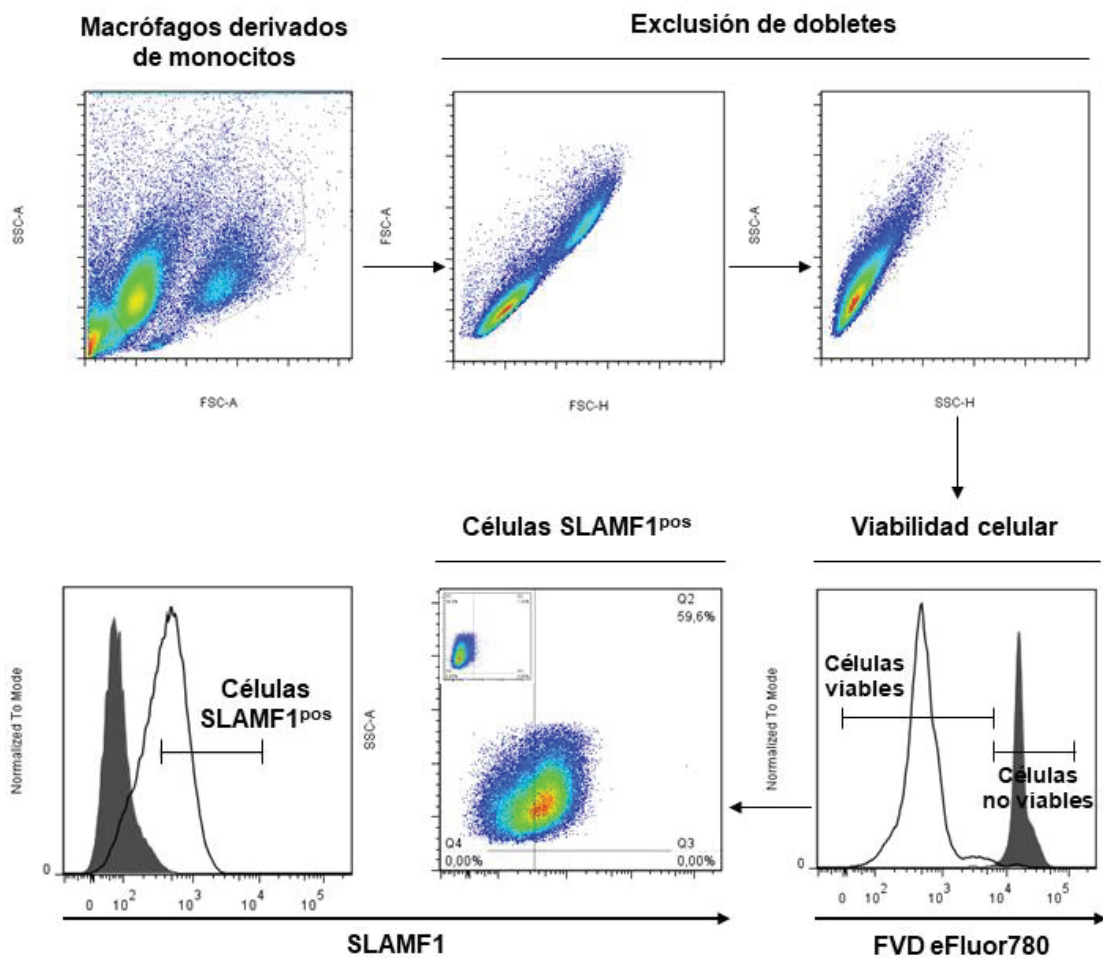


Fig. 1 Estrategia de regiones para el análisis de SLAMF1 por citometría de flujo. Después de seleccionar la población de interés (SSC-A vs. FSC-A), las células se seleccionaron para excluir los dobletes mediante una estrategia de doble singuletes (FSC-A vs. FSC-H y SSC-A vs. SSC-H). Posteriormente, las células vivas vs. muertas se determinaron empleando un colorante de viabilidad (FVD eFluor780) que marca irreversiblemente las células muertas. Se utilizaron células muertas por calor para los controles de compensación. Las células muertas se excluyeron del análisis y la expresión de SLAMF1 se evaluó en células FVD eFluor780neg (células vivas). En todos los casos, la viabilidad celular fue superior al 90%.

Microscopía Confocal

Las células THP-1 se utilizaron para experimentos de infección con *M. tuberculosis*-RFP y los macrófagos derivados de monocitos para ensayos de estimulación *in vitro* con la bacteria inactivada.

En ambos casos, se incubaron 2×10^5 células/pocillo en microplacas (Nunc) como se describió anteriormente. Dependiendo del experimento, las células fueron estimuladas con células enteras *M. tuberculosis* (WCMtb), sonicado de *M. tuberculosis* (Mtb) o Rodamina-Mtb Ags o fueron infectadas con *M. tuberculosis*-RFP.

Las células se fijaron con PFA al 4% durante 20 minutos, se lavaron con solución salina y se permeabilizaron con buffer que contenía PBS 1X, SBF al 10% y saponina al 0,5%. Posteriormente, las células se incubaron con un anticuerpo específico anti-SLAMF1 de ratón (clon A12, BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.) seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 488 (Cat. No A21121, Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.) o a Alexa Fluor 546 (Cat No. A21123, Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.). Para detectar los compartimentos endosomales / lisosomales, las células se marcaron con un anticuerpo específico anti-EEA1 (Cat No. 610456, BD Biosciences) o anti-LAMP2 (Cat No. 555803, BD Biosciences) de ratón seguidos de anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a Alexa Fluor 488 (Cat No. A21121, Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.) o a Alexa Fluor 633 (Cat No. A-21126, Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.). En todos los casos, los portaobjetos se montaron con PolyMount (Polysciences) y se analizaron usando un microscopio confocal FV-1000 con un objetivo Plan Achromatic 60X NA1.42 de inmersión en aceite (Olympus).

Medios condicionados

Las células THP-1 ($0,5 \times 10^6$ células en placas de 24 pocillos) se diferenciaron con 10 ng/ml de PMA durante 24 horas. Posteriormente, fueron estimuladas durante 24 horas en medio completo en presencia o ausencia de sonicado de *M. tuberculosis*. Los medios acondicionados (MC) se recogieron y filtraron con membrana de poros de 0,22 μm . MC de células no estimuladas se utilizaron como control (MC-control). En diferentes experimentos, las células THP-1 diferenciadas se incubaron durante 24 horas en medio completo con 10%, 25%, 50% y 75% de MC o MC-control y la expresión de SLAMF1 se determinó por citometría de flujo como se describió anteriormente.

Ensayos de interacción entre SLAMF1-*M. tuberculosis*

La interacción bioquímica entre SLAMF1 y *M. tuberculosis* se evaluó mediante dos metodologías diferentes: citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Los macrófagos derivados de monocitos de donadores sanos se estimularon con el sonicado de *M. tuberculosis* (Mtb) durante 24 horas para inducir la expresión de SLAMF1 y se prepararon extractos proteicos totales en condiciones no desnaturizantes. Brevemente, se cosecharon 1×10^6 macrófagos y se usaron 100 μ l de buffer RIPA suplementado con PMSF (1 mM) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich Cat. No P8340) para la lisis celular. La suspensión se incubó en hielo durante 1 h, se agitó con vortex cada 10 minutos y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos.

En la determinación por citometría de flujo, el extracto de proteínas totales se incubó con 1×10^6 células enteras de *M. tuberculosis* (WCMtb) durante 16-18 horas a 4°C en agitación. Posteriormente, se añadió 1% de formaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente seguido de glicina (0,125 M) durante 5 minutos para frenar la reacción del formaldehído. Se realizaron dos pasos de lavado con PBS 1X a 14000 rpm durante 5 minutos previo a la incubación con 2 mM de EGS (ThermoFisher Scientific Cat No. 21565) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron dos pasos de lavado antes de la detección de SLAMF1 por citometría de flujo con un anticuerpo específico anti-SLAMF1 PE (Cat No. 306308, BioLegend).

La interacción de SLAMF1-*M. tuberculosis* por microscopía de fluorescencia se realizó adhiriendo 10 μ l (1×10^6 bacterias) de Rodamina-*M. tuberculosis* en portaobjetos de vidrio pretratados con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 37°C. Los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS 1X y se bloquearon durante 30 minutos a temperatura ambiente con PBS 1X conteniendo 10% de SBF. Posteriormente, los extractos de proteínas totales se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Los portaobjetos se lavaron con PBS 1X antes de realizar el entrecruzamiento ("crosslinking") con formaldehído, glicina y EGS como se describió anteriormente. Los portaobjetos finalmente se incubaron con un anticuerpo específico de ratón anti-SLAMF1 seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 488 durante 30 minutos. Los portaobjetos se montaron con PolyMount (Polysciences) y se analizaron usando el microscopio de contraste de fase de fluorescencia invertida Zeiss Axiovert 40 CFL con un objetivo Plan Apochromatic 40X NA 0.5.

ELISA

La producción de TNF- α e IL-1 β humanos se determinaron en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sándwich, usando anticuerpos de ratón específicos para cada citoquina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioLegend y BD Pharmingen).

Análisis estadístico

El ANOVA de una vía RM con la prueba post hoc corregida de Tukey o la prueba de Friedman con la prueba post hoc corregida de Dunn se utilizaron para la comparación entre grupos experimentales como se indica en las leyendas de las figuras. Se utilizaron la prueba de Mann-Whitney o la prueba t no pareada para analizar las diferencias entre las muestras no pareadas. Las comparaciones entre dos grupos se evaluaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon o la prueba t pareada para muestras pareadas.

Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, CA, EE. UU.) Y, para todas las comparaciones estadísticas, se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados



Elección del modelo de estudio

Con el fin de determinar cuál era el modelo de diferenciación más apropiado para abordar nuestros objetivos de estudio, nuestro primer enfoque fue comparar la expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos diferenciados mediante distintos protocolos.

Por un lado, obtuvimos macrófagos a partir de monocitos de dadores sanos incubándolos con M-CSF o GM-CSF durante 5 días, seguido de la adición de citoquinas polarizantes como IFN- γ , IL-4 e IL-10 por 48 horas, emulando la generación de los perfiles de los denominados macrófagos M1, M2a y M2c (**Fig. 1 A**). Por otro lado, obtuvimos macrófagos después de cultivar monocitos por 2 horas en ausencia de SBF para favorecer la adherencia seguido de otras 16-18 horas de cultivo en medio fresco (resting) (**Fig. 1 B**). En ambos casos, luego de diferenciarlos, los macrófagos se estimularon por 24 o 48 horas en presencia o ausencia de un sonicado de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Como se puede observar en la figura 1A, los niveles de SLAMF1 se encontraron en menos del 5% de los macrófagos diferenciados por 7 días independientemente de su perfil de activación (M1, M2a o M2c). La estimulación con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) no aumentó la expresión de SLAMF1 en ninguno de los tres perfiles. Por el contrario, la expresión de SLAMF1 fue evidente en macrófagos derivados de monocitos diferenciados por adherencia seguido de resting por 16-18 horas, estimulados durante 24 o 48 horas con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*). Los niveles más altos se observaron a las 24 horas. Estos hallazgos sugieren una expresión transitoria de SLAMF1 en la membrana de macrófagos derivados de monocitos cultivados *in vitro*.

Adicionalmente, evaluamos la expresión de algunos marcadores de activación típicos en macrófagos derivados de monocitos obtenidos por adherencia seguido de resting luego de 24 horas de estimulación antigénica con *Mtb* (**Fig. 1C**). Observamos altos niveles de las moléculas de superficie CMH II y CD86 tanto en células estimuladas como no estimuladas. Por otra parte, no observamos expresión de los marcadores CD163 o CD206 relacionados con el perfil M2. Así, estos macrófagos muestran expresión de marcadores de diferenciación hacia macrófagos asociados a un perfil proinflamatorio.

Teniendo en cuenta estos resultados, todos los experimentos realizados en el presente trabajo se realizaron utilizando el esquema de diferenciación de adherencia por 2 horas seguido de 16-18 horas en medio completo (resting) para luego ser estimulados con antígenos por 24 horas.

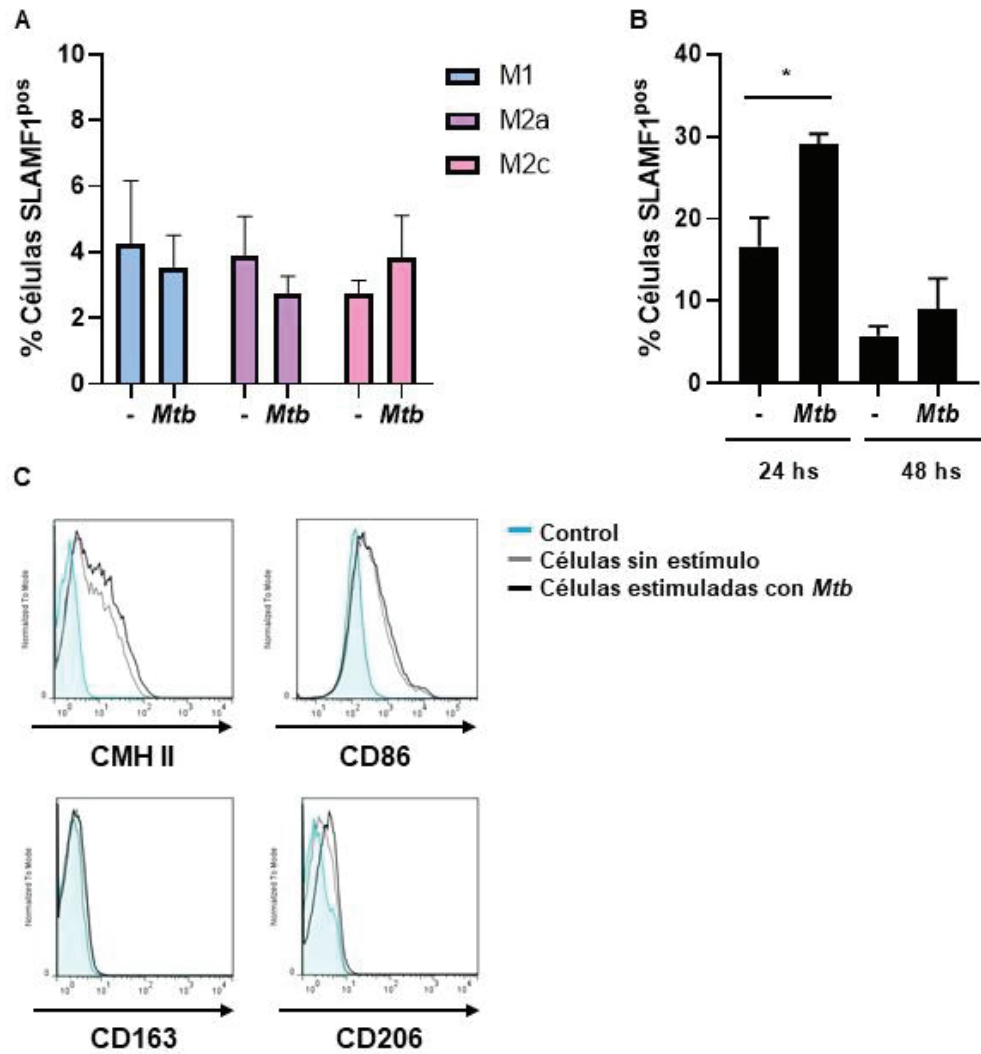


Fig. 1. Elección del modelo de estudio. Los monocitos CD14 positivos se obtuvieron de sangre periférica de donadores sanos mediante selección magnética positiva. **(A)** Se permitió que las células se diferenciaron durante 5 días con M-CSF para M2 o GM-CSF para M1 (10 ng/ml cada una). La polarización de los macrófagos se indujo añadiendo IFN- γ 200U/ml, M1), IL-4 (20 ng/ml, M2a) o IL-10 (10 ng/ml, M2c) durante 48 horas adicionales. A partir de entonces, los macrófagos se estimularon con un sonicated de *M. tuberculosis* (*Mtb*) durante 24 horas y se evaluó la expresión de SLAMF1 por citometría de flujo. **(B-C)** Luego de la adherencia por 2 horas en ausencia de suero bovino fetal e incubación por 16-18 horas en medio completo (resting), los macrófagos se estimularon o no con *Mtb* durante 24 y 48 horas y se evaluó la expresión de SLAMF1 **(B)** o de CMH II, CD86, CD163 y CD206 **(C)** mediante citometría de flujo.

(A-B) Porcentajes de células positivas para SLAMF1 evaluadas por citometría de flujo. Las barras representan la media \pm SEM. Prueba de Friedman con la prueba post hoc de Dunn corregida. *, $p < 0,05$
 (C) Se muestran histogramas representativos de citometría de flujo.

M. tuberculosis induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos

Los niveles de SLAMF1 en la superficie de los macrófagos dependen del modelo experimental⁷⁸⁻⁸⁰. La expresión de SLAMF1 se ha demostrado en macrófagos murinos estimulados con BCG y en macrófagos humanos estimulados con diferentes cepas de *Mycobacterium* o sus componentes celulares^{75,81,82}. Sin embargo, el papel de SLAMF1 en la regulación de las funciones de los macrófagos permanece poco explorado. Con este fin, primero caracterizamos la expresión de SLAMF1 determinando los niveles proteicos de SLAMF1 en monocitos recién aislados de sangre periférica y macrófagos derivados de monocitos de donadores sanos estimulados con un sonocado de *M. tuberculosis* (*Mtb*). Los niveles de SLAMF1 fueron muy bajos en monocitos como ha sido reportado previamente^{83,84} (**Fig. 2A**). En los macrófagos derivados de monocitos, la expresión de SLAMF1 aumentó significativamente en comparación con los monocitos (**Fig. 2A**). Más aún, la estimulación con el sonocado de *M. tuberculosis* (*Mtb*), indujo un incremento significativo de los niveles de SLAMF1 en la superficie celular, tanto en porcentaje como en intensidad de fluorescencia media determinada por citometría de flujo (**Fig. 2A-C**). Mientras que la cantidad de moléculas SLAMF1 por célula aumentó en 9 de 15 muestras (**Fig. 2C**), el número de células que expresaron SLAMF1 en respuesta a *Mtb* aumentó en todas las muestras de los donadores analizados (**Fig. 2B**). Además, también observamos un aumento en la expresión intracelular de SLAMF1 por microscopía confocal (**Fig. 2D**). Estos resultados demuestran que SLAMF1 se expresa no solo en la superficie celular sino también intracelularmente luego de la estimulación con *M. tuberculosis*. Según nuestro conocimiento, no existen estudios previos que reporten la expresión de SLAMF1 en el linaje monocito-macrófago en el sitio de infección durante la Tuberculosis. Curiosamente, observamos que los pacientes con Tuberculosis activa evidenciaron una expresión de SLAMF1 aumentada en las células CD14 positivas obtenidas de derrames pleurales (DP) en comparación con las células CD14 positivas provenientes de sangre periférica (SP) de los mismos pacientes (**Fig. 2E**). Estos hallazgos indican que SLAMF1 podría tener un papel activo en el sitio de la infección y refuerzan el modelo de estudio elegido para realizar los experimentos *in vitro*.

En conjunto, nuestros resultados demuestran no solo que *M. tuberculosis* induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos *in vitro*, sino también que este receptor podría ser un posible regulador de las funciones de los macrófagos *in vivo*.

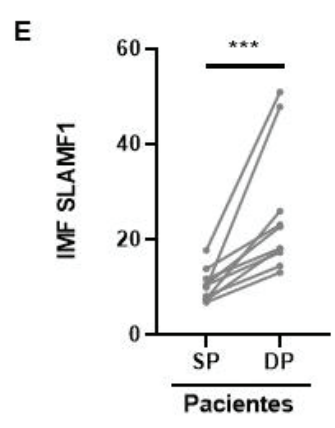
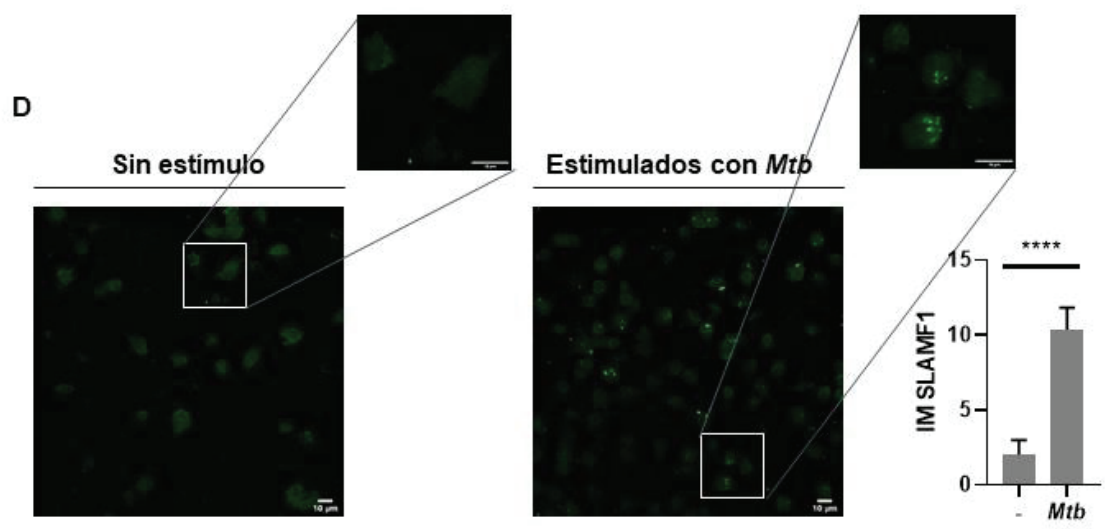
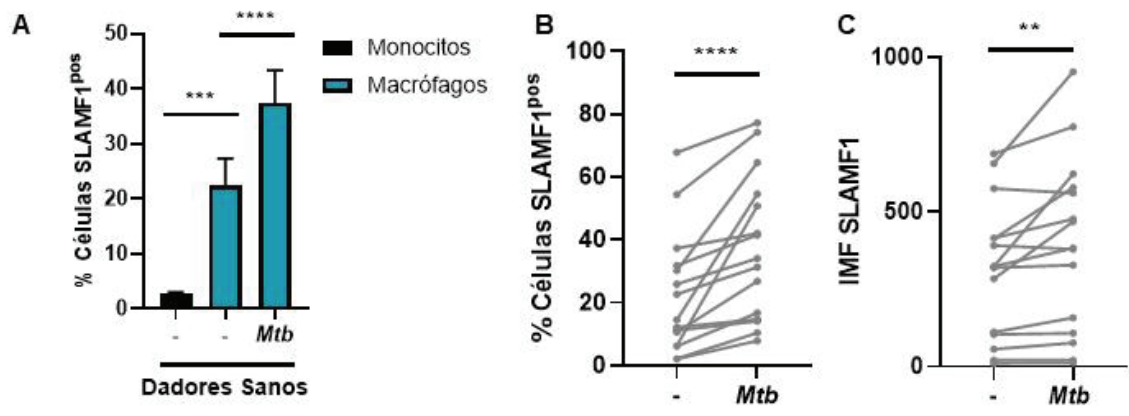


Fig. 2 Expresión de SLAMF1 en monocitos y macrófagos humanos. (A-C) Los monocitos CD14 positivos se obtuvieron a partir de sangre periférica de dadores sanos mediante selección magnética positiva. Después de la adherencia e incubación en medio completo durante 16-18 horas, los macrófagos se estimularon con un sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) durante 24 horas y la expresión de SLAMF1 se evaluó mediante citometría de flujo (CF). (B-C) Se muestran los valores individuales de SLAMF1 para macrófagos no estimulados o estimulados con *Mtb*, en porcentaje (B) e a intensidad media de fluorescencia (IMF) (C). (D) En el panel derecho se muestran micrográficas confocales representativas de macrófagos no estimulados o estimulados con *Mtb* con la respectiva cuantificación de la intensidad de fluorescencia para SLAMF1. La intensidad media de SLAMF1 se calculó utilizando el software Fiji. Se utilizaron imágenes DIC (contraste de interferencia diferencial) para dibujar manualmente un contorno para cada célula y crear una región de interés (ROI). Luego, se restó el ruido de fondo y se midió la intensidad de fluorescencia promedio para cada ROI. Se analizaron al menos 100 células por tratamiento en tres experimentos independientes. (E) Se obtuvieron muestras pareadas de derrames pleurales (DP) y sangre periférica (SP) de pacientes con Tuberculosis. La IMF de SLAMF1 en células CD14 positivas se determinó mediante citometría de flujo.

Las barras representan la media \pm SEM. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. A-C y E, Prueba de suma de rangos de Wilcoxon. D, prueba de Mann-Whitney.

La línea celular THP-1 es utilizada ampliamente como modelo celular *in vitro* para monocitos y macrófagos⁸⁵. Por lo tanto, evaluamos la expresión de SLAMF1 en estas células luego de la diferenciación con PMA y estimulación con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) (Fig. 3A-B). Dado que las células THP-1 estimuladas exhibieron los mayores niveles de SLAMF1 en su superficie, utilizamos estas células como modelo para estudiar los macrófagos en el contexto de la infección por *M. tuberculosis*.

Teniendo en cuenta que la inducción de la expresión de SLAMF1 podría deberse a un efecto directo de *M. tuberculosis* o a una activación bystander, se generaron medios condicionados. Las células THP-1 se cultivaron con medios condicionados (MC) de células no estimuladas (control) o estimuladas con el sonicado de *M. tuberculosis* por 24 horas. No se observaron diferencias en la expresión de SLAMF1 cuando se cultivaron células THP-1 con MC de células estimuladas con *M. tuberculosis* o MC de células no estimuladas, en comparación con el control (células no estimuladas incubadas en medio fresco completo) (Fig. 3C). Este resultado indica que la expresión de SLAMF1 se incrementa en las células que interactúan con *M. tuberculosis* y no es a causa de un efecto bystander. Adicionalmente, evaluamos si cantidades más altas del sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) podían conducir a niveles más altos de SLAMF1. Como se muestra en la figura, no se detectaron cambios en los niveles de SLAMF1 al aumentar la relación bacteria:macrófago (Fig. 3D-E).

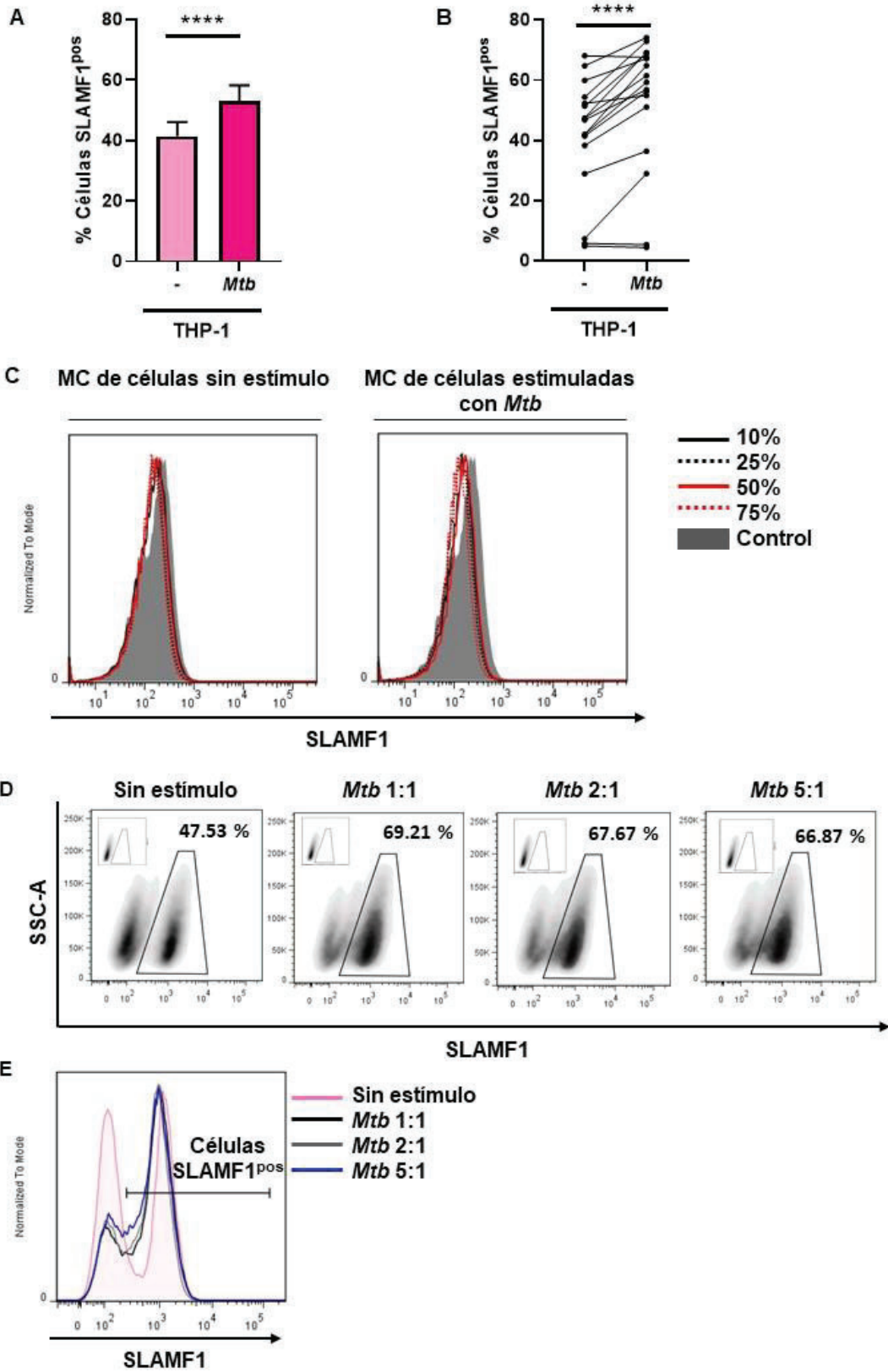


Fig. 3 Expresión de SLAMF1 en células THP-1. (A) Se estimularon células THP-1 diferenciadas con PMA con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) durante 24 horas y se determinó la expresión de SLAMF1 mediante citometría de flujo. (B) Se muestran los valores individuales de SLAMF1 para células THP-1 no estimuladas o estimuladas con *Mtb*. (C) Se estimularon células THP-1 diferenciadas con PMA con 10%, 25%, 50% o 75% de medio acondicionado (MC) de células THP-1 estimuladas con *Mtb*. Se muestran histogramas de representativos de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de SLAMF1 en comparación con las células incubadas en medio fresco (control). (D-E) Las células THP-1 diferenciadas con PMA se estimularon con diferentes cantidades del sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) durante 24 horas y la expresión de SLAMF1 se determinó mediante citometría de flujo. Se muestran gráficos de densidad representativos (D) e histogramas (E).

Mtb 1: 1, 10 μ l del sonicado de *M. tuberculosis* / 1×10^6 células (10 μ l = 1×10^6 bacterias)

Mtb 2: 1, 20 μ l del sonicado *M. tuberculosis* / 1×10^6 células (20 μ l = 2×10^6 bacterias)

Mtb 5: 1, 50 μ l del sonicado *M. tuberculosis* / 1×10^6 células (50 μ l = 5×10^6 bacterias)

Las barras representan la media \pm SEM. *, $p = 0,05$; **, $p = 0,01$; ***, $p < 0,001$. Prueba t pareada A-B.

Para caracterizar aún más la regulación de la expresión de SLAMF1, decidimos estimular los macrófagos con diferentes citoquinas *in vitro*. Las células THP-1 se estimularon en presencia o ausencia del sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) junto con IFN- γ , IL-4 o IL-10 recombinantes humanos como citoquinas representativas de respuestas inflamatorias, antiinflamatorias o reguladoras, respectivamente. Cuando evaluamos la expresión de SLAMF1 en la superficie celular por citometría de flujo, encontramos que el tratamiento con IFN- γ indujo niveles de SLAMF1 similares a los inducidos por el sonicado de *M. tuberculosis* (Fig. 4A y C). Más aún, cuando las células fueron estimuladas simultáneamente con *M. tuberculosis* e IFN- γ , los niveles de SLAMF1 fueron aún mayores que los observados con el sonicado de *M. tuberculosis* o IFN- γ por separado (Fig. 4A). Los mismos resultados fueron observados en los macrófagos primarios (Fig. 4C), indicando que la expresión de SLAMF1 en los macrófagos es inducida principalmente por estímulos proinflamatorios.

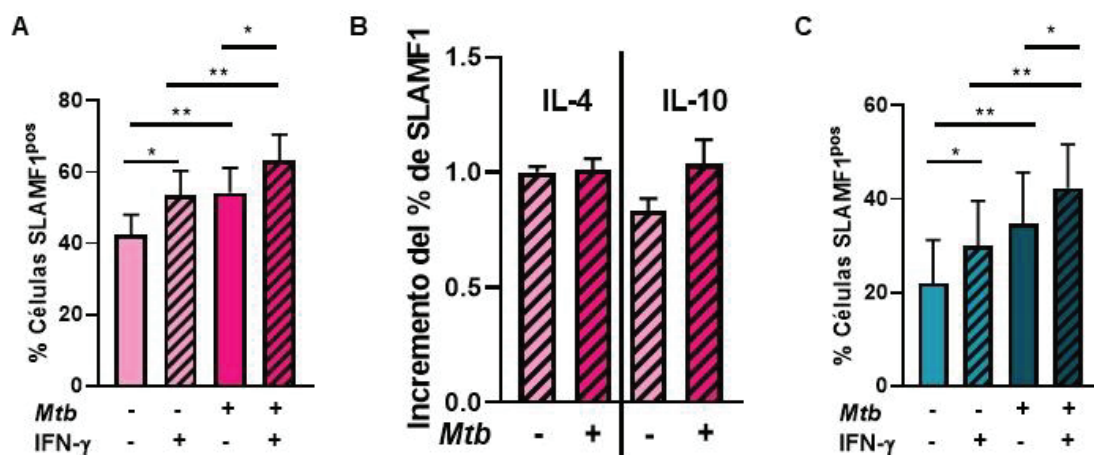


Fig. 4 Efecto de las citoquinas sobre la expresión de SLAMF1. Células THP-1 diferenciadas con PMA se estimularon con o sin el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) en presencia o ausencia de rhIFN- γ (A), rhIL-4 o rhIL-10 (B) y se determinó la expresión de SLAMF1 mediante citometría de flujo. (C) Se estimularon macrófagos derivados de monocitos de donadores sanos con o sin *Mtb* durante 24 horas en presencia o ausencia de rhIFN- γ y la expresión de SLAMF1 se determinó mediante citometría de flujo.

A y C, Las barras representan la media \pm SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. A ANOVA de una vía de mediciones repetidas, B ANOVA de una vía.

B, Las barras representan el porcentaje de células SLAMF1 positivas tratadas con rhIL-4 o rhIL-10 relativizadas al porcentaje de las células no estimuladas o estimuladas con *Mtb*.

SLAMF1 no modula la secreción de TNF- α e IL-1 β inducida por *M. tuberculosis* en macrófagos humanos

Dado que SLAMF1 puede actuar como un receptor autoligando ⁸⁶ evaluamos si la activación a través de esta molécula podría modular la secreción de citoquinas por los macrófagos. Con este fin, las células THP-1 se cultivaron durante 4 o 24 horas en presencia o ausencia del sonicado de *M. tuberculosis* junto con un anticuerpo agonista para SLAMF1 (α -SLAMF1, A12). Posteriormente, la secreción de TNF- α e IL-1 β se midió en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Ambas citoquinas aumentaron luego de la estimulación con *M. tuberculosis* (Fig. 5A-B). Mientras que la producción de TNF- α se indujo luego de 4 horas de estimulación, los niveles de IL-1 β aumentaron significativamente 24 horas después de la adición de *M. tuberculosis*. Sin embargo, no observamos diferencias en los niveles de secreción de estas citoquinas en respuesta a la estimulación con anticuerpo α -SLAMF1 (A12). Es importante destacar que no se detectaron cambios en la viabilidad celular luego del tratamiento con α -SLAMF1 (Fig. 5C).

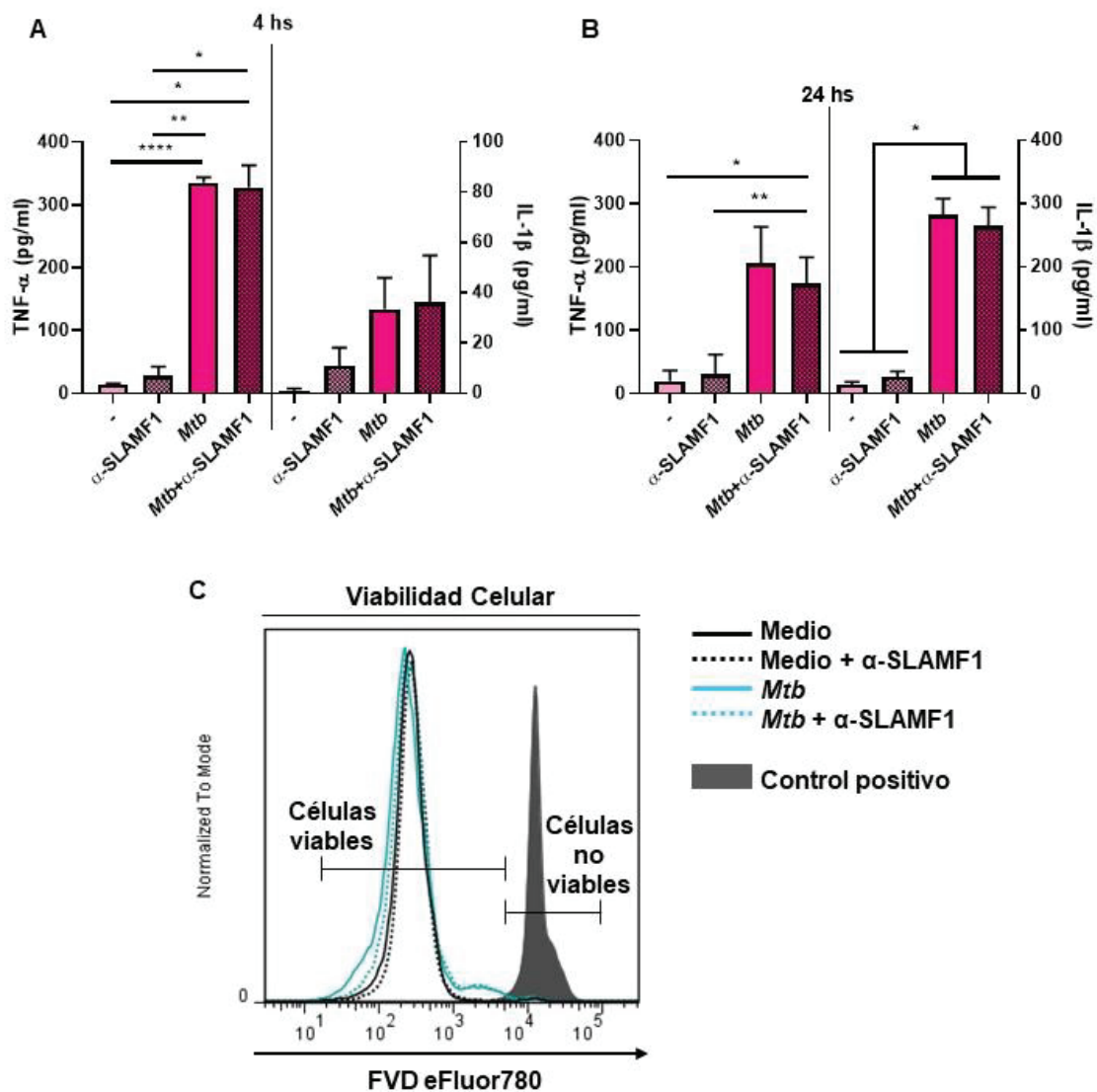


Fig. 5 Efecto de la coestimulación a través de SLAMF1 sobre la producción de citoquinas frente a *M. tuberculosis*. Se estimularon células THP-1 diferenciadas con PMA con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) durante 4 (A) o 24 (B) horas en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista para SLAMF1 (α -SLAMF1). Se recuperaron los sobrenadantes de cultivo y se midieron los niveles de TNF- α e IL-1 β humanos mediante ELISA. Las barras representan la media \pm SEM. *, $p = 0,05$; ****, $p < 0,0001$. ANOVA de una vía de mediciones repetidas. (C) Se estimularon macrófagos de donadores sanos y células THP-1 diferenciadas con PMA con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista para SLAMF1 (α -SLAMF1). Para evaluar el efecto del tratamiento con α -SLAMF1 sobre la viabilidad celular, las células se tiñeron con el tinte de viabilidad FVD eFluor780. Se muestran histogramas de citometría de flujo representativos para macrófagos derivados de monocitos.

Estos datos demuestran que la señalización promovida por la activación de SLAMF1 no regula la producción de TNF- α ni de IL-1 β por las células THP-1 estimuladas con *M. tuberculosis* en los tiempos estudiados en este trabajo.

SLAMF1 estimula la interacción entre *M. tuberculosis* y los macrófagos

Como fagocitos profesionales, una de las funciones principales de los macrófagos es reconocer los patógenos, internalizarlos y destruirlos. Con este fin, expresan varios receptores endocíticos en su superficie y utilizan distintos mecanismos para internalizar microorganismos dentro de la célula.

Aunque se ha demostrado el papel de SLAMF1 en algunas funciones de los macrófagos^{67,87,88}, el hecho de si las interacciones homofílicas de SLAMF1 (SLAMF1-SLAMF1) conducen a promover vías de señalización que aumentan la capacidad fagocítica de estas células aún no se conoce.

Por lo tanto, decidimos evaluar el rol de SLAMF1 en la interacción *M. tuberculosis*-macrófagos. Para esto, las células THP-1 y los macrófagos derivados de monocitos se cultivaron durante 24 horas con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb*-R Ags) en presencia o ausencia de α -SLAMF1 (A12). En primer lugar, los resultados demostraron la capacidad de las células THP-1 y de los macrófagos derivados de monocitos para internalizar *Mtb*-R Ags por citometría de flujo (Fig. 6A). Más aun, la adición del anticuerpo agonista para SLAMF1 (α -SLAMF1, A12) condujo a un marcado aumento en el porcentaje de células que interactúan con la bacteria, tanto en la línea celular como en los macrófagos provenientes de donadores sanos (Fig. 6B).

Por otro lado, como observamos que el IFN- γ es capaz de inducir la expresión de SLAMF1, evaluamos si también puede modular la internalización de *M. tuberculosis*. Sin embargo, el agregado de IFN- γ recombinante humano no produjo cambios en la interacción de los macrófagos ni de las células THP-1 con *M. tuberculosis* (Fig. 6C), sugiriendo que la activación a través de SLAMF1 es necesaria para inducir la internalización de la bacteria.

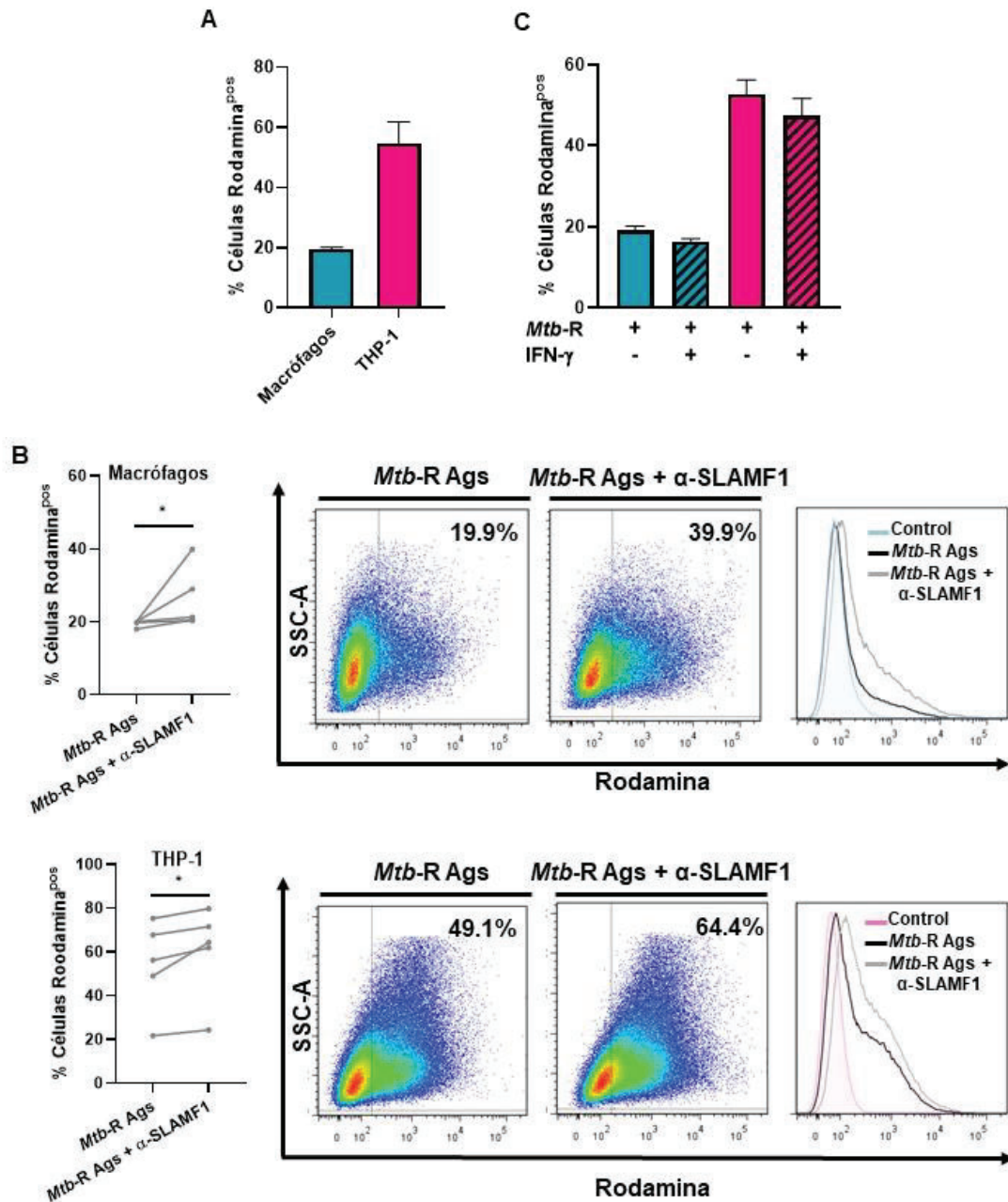


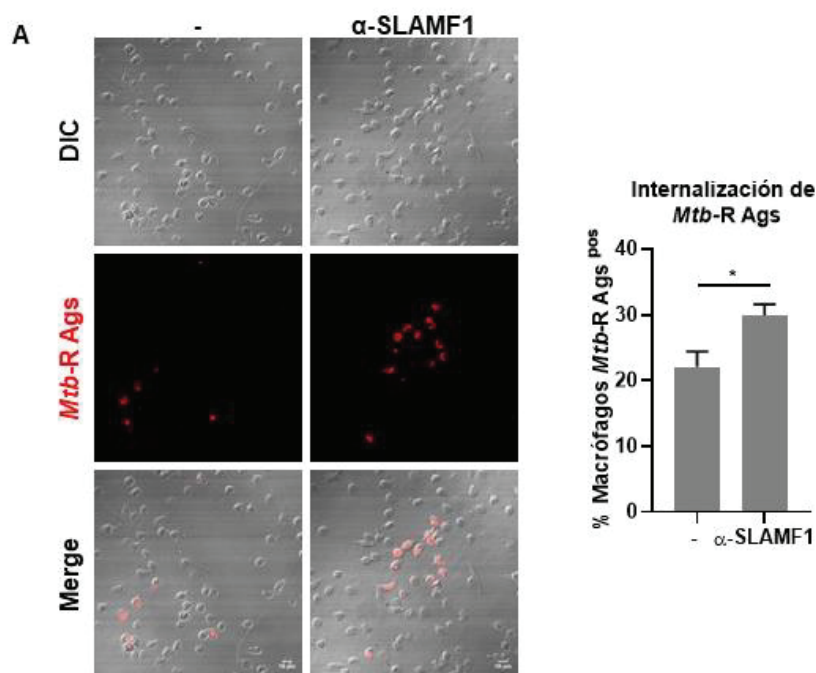
Fig. 6 Rol de SLAMF1 en la interacción macrófagos-*M. tuberculosis*. (A) Los macrófagos de donadores sanos y las células THP-1 diferenciadas con PMA se estimularon con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb-R Ags*) por 24 horas. Se muestran los porcentajes de células de rodamina positivas como medida de internalización. Los macrófagos (panel superior) y las células THP-1 (panel inferior) se estimularon como en A en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista α -SLAMF1 (B) o rIFN- γ (C).

B, Se muestran los porcentajes de células de rodamina positivas, los gráficos de puntos y los histogramas representativos obtenidos por citometría de flujo. *, $P < 0,05$. Prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

C, Las barras representan la media \pm SEM del porcentaje de células Rodamina positivas.

Además, estudiamos la internalización de *M. tuberculosis* por microscopía confocal. Para evaluar esto, los macrófagos primarios fueron estimulados con *Mtb*-R Ags durante 24 horas en presencia o ausencia de α -SLAMF1 (A12). En otro conjunto de experimentos, las células THP-1 diferenciadas con PMA se infectaron con *M. tuberculosis*-RFP viva (MOI 5:1) en presencia o ausencia de α -SLAMF1 (A12) durante 2 horas y luego fueron cultivadas en medios completos durante 22 horas adicionales con o sin α -SLAMF1.

En concordancia con nuestros resultados anteriores, la coestimulación a través de SLAMF1 aumentó el porcentaje de internalización de *M. tuberculosis* en macrófagos primarios (**Fig. 7A**). Más aún, encontramos que la activación de SLAMF1 mediada por el anticuerpo agonista anti-SLAMF1 aumentó el porcentaje de células infectadas por *M. tuberculosis* (**Fig. 7B**). En conjunto, estos hallazgos demuestran que SLAMF1 regula la interacción entre los macrófagos y *M. tuberculosis*, ya sean bacterias muertas o vivas.



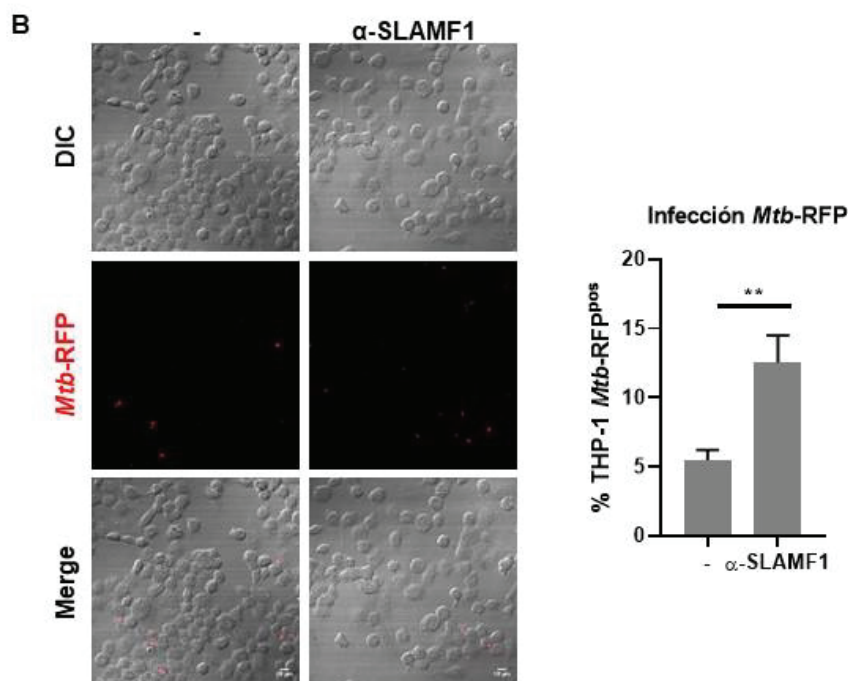


Fig. 7 Rol de SLAMF1 en la interacción de las células humanas con *M. tuberculosis*. (A) Los macrófagos de donadores sanos se estimularon con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb*-R Ags) en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista α -SLAMF1 por 24 horas. Se evaluó la internalización de *Mtb*-R Ags por microscopía confocal. La figura muestra micrografías confocales representativas y se muestra la cuantificación del número de células que interactúan con *Mtb*-R Ags en relación con las células totales. (B) Las células THP-1 diferenciadas con PMA se infectaron con *M. tuberculosis* RFP viva (*Mtb*-RFP) durante 2 horas en presencia / ausencia de un anticuerpo agonista α -SLAMF1. Las células se lavaron para eliminar las bacterias extracelulares y se incubaron durante 22 horas adicionales \pm α -SLAMF1.

A, Las barras representan la media \pm SEM. *, $p < 0.05$. prueba de Mann-Whitney. B, Las barras representan la media \pm SEM del porcentaje de infección en relación con las células totales. **, $p < 0.01$. Prueba t no emparejada.

SLAMF1 interactúa con *M. tuberculosis* en los macrófagos

Como se mencionó anteriormente, SLAMF1 también puede actuar como un sensor microbiológico capaz de reconocer y mediar la internalización de ciertas bacterias⁸⁹, por lo que decidimos estudiar la posible interacción entre SLAMF1 y *M. tuberculosis*. Con este fin, los macrófagos derivados de monocitos fueron estimulados con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb*-R Ags) y 24 horas después se estudió la colocalización de SLAMF1 con *Mtb*-R Ags por microscopía confocal (Fig. 8A). Más de la mitad de las células mostraron colocalización entre SLAMF1 y *M. tuberculosis* (Tabla 1). Además, observamos un elevado índice de Manders, lo que indica un alto grado de colocalización en las células estimuladas (Fig. 8B).

Adicionalmente, utilizamos células enteras de *M. tuberculosis* marcadas con FITC (*WCMTB*-FITC) como estímulo para los macrófagos. En primer lugar, observamos que las células enteras de *M. tuberculosis* (*WCMTB*) inducen niveles de SLAMF1 en la superficie celular similares a los inducidos por el sonicado (Fig. 9A). Posteriormente, al evaluar células estimuladas con *WCMTB*-FITC por

microscopía confocal, encontramos un alto grado de colocalización entre las células enteras de *M. tuberculosis* y SLAMF1 (Fig 9B), lo que sugiere que la interacción entre SLAMF1 y *M. tuberculosis* involucra una molécula que se encuentra accesible tanto en el sonicado como en la bacteria completa.

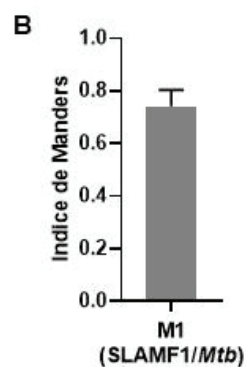
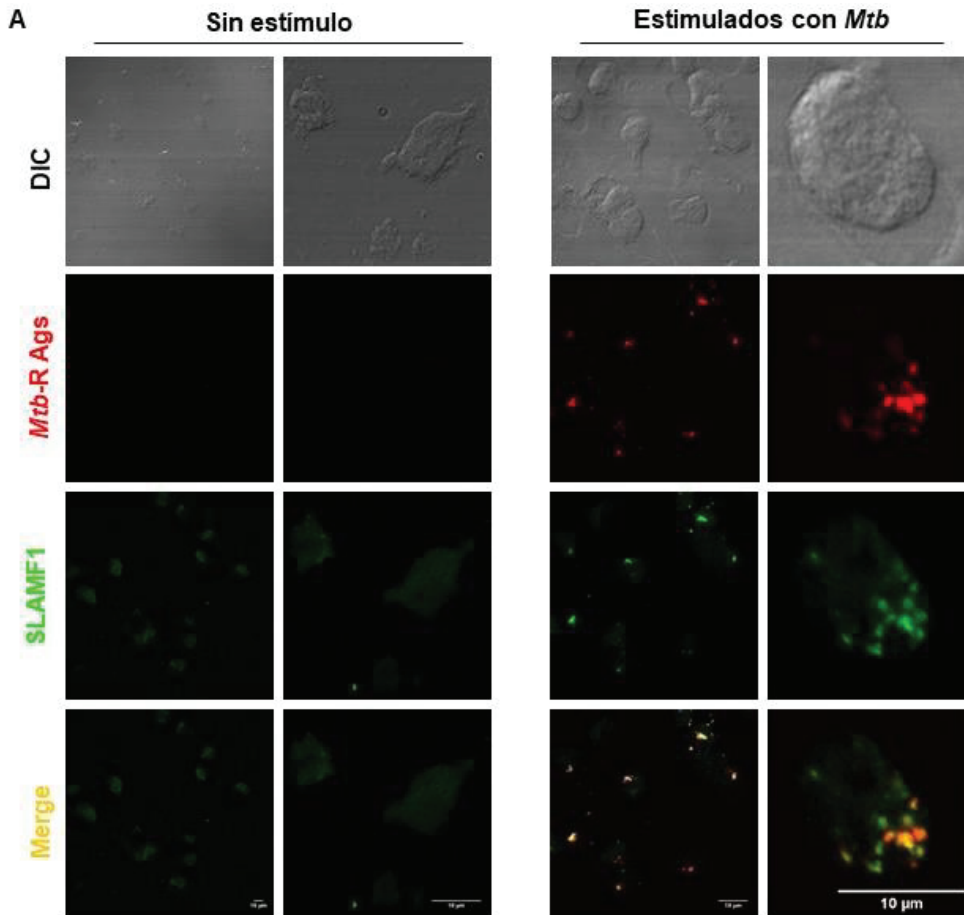


Fig. 8 Colocalización SLAMF1-*M. tuberculosis*. (A) Los macrófagos provenientes de dadores sanos se estimularon durante 24 horas con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb*-R Ags). Para la detección de SLAMF1 se utilizó un anticuerpo específico de ratón anti-SLAMF1 humano seguido de anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Flúor 488 (verde). Los macrófagos no estimulados se usaron como control. Se muestran micrografías confocales representativas para una sola célula o micrografías confocales panorámicas. SLAMF1 se detectó después de la fijación y permeabilización de las células. DIC, contraste de interferencia diferencial. (B) Las barras representan la media \pm SEM del índice de Manders, donde M1 fue el coeficiente de colocalización de Manders con umbrales, calculados en el “plugin” Coloc 2 Fiji, con la tinción anti-SLAMF1 como primer canal.

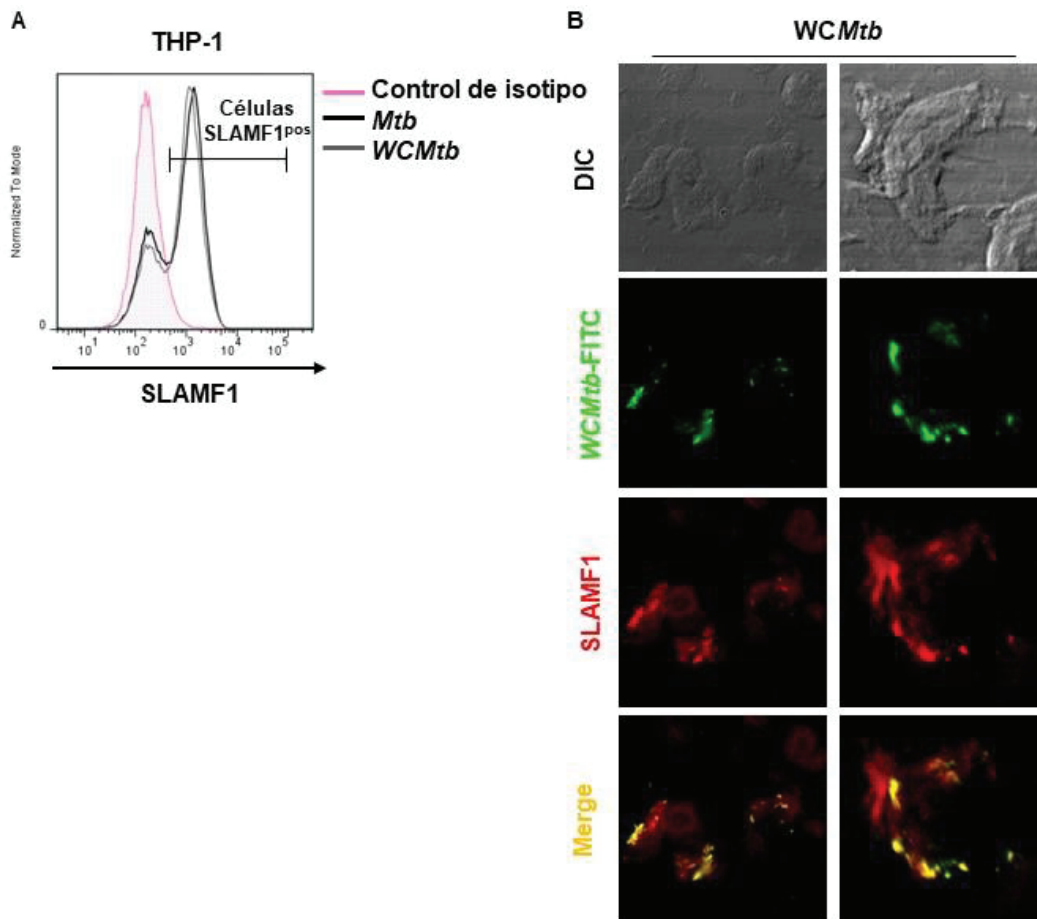


Fig. 9 Colocalización de SLAMF1 con células enteras de *M. tuberculosis*. (A) Células THP-1 diferenciadas con PMA se estimularon con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) o células enteras de *M. tuberculosis* (*WCMtb*) durante 24 horas y la expresión de SLAMF1 se determinó por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos. (B) Macrófagos derivados de monocitos de donadores sanos se estimularon durante 24 horas con células completas de *M. tuberculosis* marcadas con FITC (*WCMtb*-FITC). Se utilizó un anticuerpo específico de ratón anti-SLAMF1 humano seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Flúor 546 (rojo) para la detección de SLAMF1 luego de fijar y permeabilizar las células. Se muestran micrografías confocales representativas para células únicas. Índice de Manders (M2) de 0,96 (panel izquierdo) y 0,902 (panel derecho). M2 fue el coeficiente de colocalización de Manders de cada célula con umbrales calculados en el “plugin” Coloc 2 Fiji con la tinción anti-SLAMF1 como segundo canal.

Tabla 1	% de células que expresan SLAMF1	% Colocalización SLAMF1- <i>Mtb</i>
Macrófagos estimulados con <i>Mtb</i> -R Ags	34,54 ± 4,7	54,31 ± 13,36

Tabla 1. Colocalización SLAMF1-*M. tuberculosis*. Los macrófagos provenientes de donadores sanos se estimularon durante 24 horas con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb*-R Ags). Para la detección de SLAMF1 por microscopía confocal se utilizó un anticuerpo específico de ratón anti-SLAMF1 humano seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Flúor 488 (verde). Se calculó el porcentaje de células SLAMF1 positivas en relación con las células totales y el porcentaje de células SLAMF1 positivas que se colocalizan con *Mtb*-R Ags en relación con las células SLAMF1 positivas totales.

Con el objetivo de demostrar la interacción SLAMF1-*M. tuberculosis* realizamos ensayos de interacción bioquímica. Primeramente, incubamos extractos de proteínas totales de macrófagos derivados de monocitos con células enteras de *M. tuberculosis* (WCMTB). Después de un tratamiento de crosslinking, la detección de SLAMF1 se realizó por citometría de flujo. Observamos altos niveles de tinción positiva para SLAMF1 (**Fig. 10A**), lo cual proporciona una prueba bioquímica de interacción entre SLAMF1 y *M. tuberculosis*.

Adicionalmente, estudiamos la interacción adhiriendo el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb-R Ags*) a portaobjetos recubiertos con poli-D-lisina. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron con extractos de proteínas totales de macrófagos derivados de monocitos. Después del tratamiento de crosslinking, SLAMF1 se detectó por microscopía de fluorescencia. En concordancia con los resultados obtenidos por citometría de flujo con *M. tuberculosis* completa, demostramos la existencia de interacción entre *M. tuberculosis*-R Ags y SLAMF1 como se muestra en la superposición (merge) de las imágenes (**Fig. 10B**). Se realizaron además múltiples controles de unión inespecífica del anticuerpo primario (anti-SLAMF1) y secundario utilizados que permitieron corroborar la especificidad de la interacción detectada (**Tabla 2**).

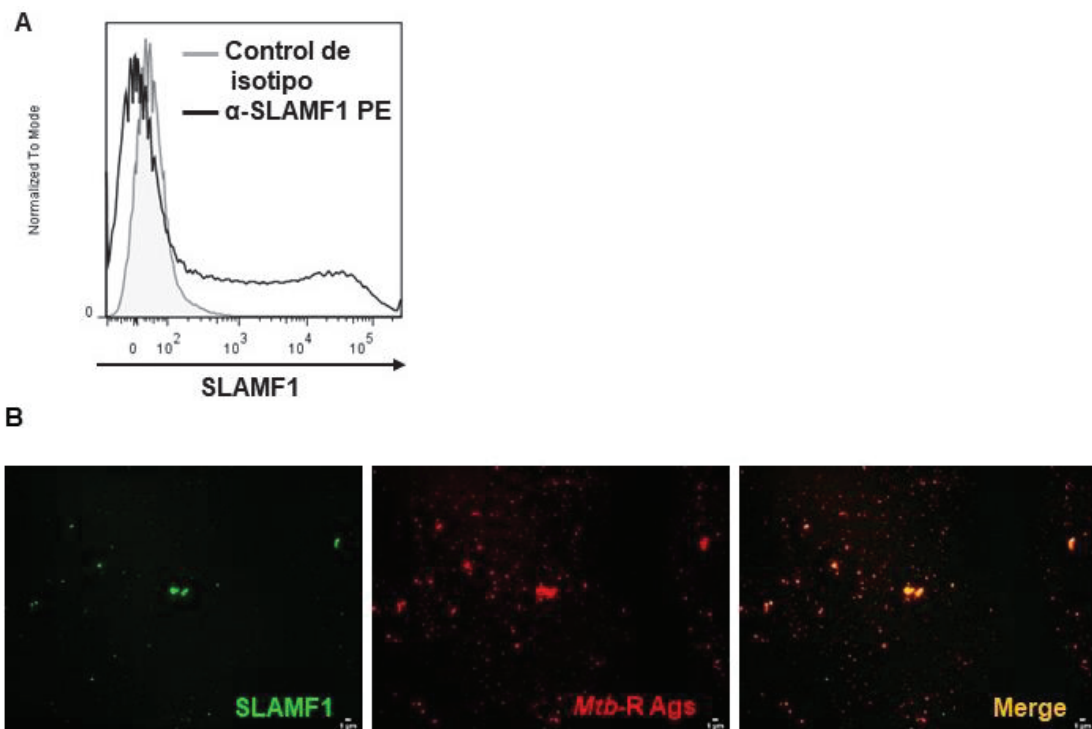


Fig. 10 Interacción de SLAMF1 con *M. tuberculosis*. Macrófagos derivados de monocitos de dadores sanos se estimularon con el sonicated *M. tuberculosis* durante 24 horas para inducir la expresión de SLAMF1 y se prepararon extractos de proteínas celulares totales en condiciones no desnaturalizantes. **(A)** Los extractos de proteínas se incubaron con 1×10^6 células enteras de *M. tuberculosis* (WCMTB). Después del crosslinking con formaldehído, glicina y EGS, se detectó SLAMF1 por citometría de flujo utilizando anticuerpo específico anti-SLAMF1 PE. Se muestra un histograma representativo. **(B)** $10 \mu\text{l}$ (1×10^6 bacterias) del sonicated de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb-R Ags*) se adhirieron en portaobjetos pretratados con poli-D-lisina. Después del bloqueo, los portaobjetos se incubaron con extractos de proteínas totales. El crosslinking se realizó con formaldehído, glicina y EGS y se utilizó un anticuerpo específico de ratón anti-SLAMF1 humano y un anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Flúor 488 para la detección de SLAMF1. Los portaobjetos se montaron y analizaron usando un objetivo 40X de un microscopio de contraste de fase de fluorescencia invertido. Las imágenes fusionadas se muestran en amarillo. Barra de escala: $1 \mu\text{m}$

<u>Tabla 2</u>	Canal Verde	Canal Rojo
<i>Mtb-R Ags</i>	-	+
<i>Mtb-R Ags</i> + extracto de proteínas de macrófagos	-	+
<i>Mtb-R Ags</i> + anti-ratón Alexa Fluor 488 (control de pegado inespecífico del anticuerpo secundario)	-	+
<i>Mtb-R Ags</i> + anti-SLAMF1 + anti-ratón Alexa Fluor 488 (en ausencia del extracto proteico. Control de pegado inespecífico del anticuerpo anti-SLAMF1 a <i>M. tuberculosis</i>)	-	+
<i>Mtb-R Ags</i> + extracto de proteínas de macrófagos + anti-ratón Alexa Fluor 488 (control de pegado inespecífico del anticuerpo secundario)	-	+

Tabla 2. Controles del ensayo de interacción por microscopía de fluorescencia. Portaobjetos pretratados con poli-D-lisina se incubaron con *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb-R Ags*), se bloquearon y se realizó el entrecruzamiento con formaldehído, glicina y EGS. Las marcaciones se realizaron siguiendo el mismo protocolo mencionado en la Fig. 10. Los signos + indican los canales en los que se observó señal. En todos los casos se observó únicamente marca en el canal rojo correspondiente al extracto de la bacteria marcada con Rodamina.

Estos datos demuestran que SLAMF1 es capaz de reconocer una firma molecular presente en *M. tuberculosis*, señalando a SLAMF1 como un nuevo receptor innato en macrófagos humanos.

SLAMF1 participa del proceso de maduración endolisosomal en los macrófagos

La internalización de microorganismos dentro de la célula es seguida por la fusión de los endosomas con los lisosomas, lo que finalmente promueve la muerte de los patógenos endocitados dentro del fagolisosoma.

Como propusimos que SLAMF1 actúa como receptor de *M. tuberculosis* y como modulador de las respuestas de los macrófagos, y considerando que Berger y col. demostraron que el proceso de maduración fagolisosomal se ve retrasado en los macrófagos deficientes para SLAMF1 infectados con *E. coli*⁶⁷, decidimos evaluar la ubicación conjunta de SLAMF1 con marcadores endosomales tempranos y tardíos en macrófagos estimulados con *M. tuberculosis*.

En consecuencia, primero estudiamos si *M. tuberculosis* se dirige a través de la vía endolisosomal. Para este propósito, estimulamos los macrófagos derivados de monocitos con el sonicatedo de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb*-R Ags) por 24 horas. Luego se evaluó la colocalización entre las bacterias y dos marcadores endosomales diferentes por microscopía confocal. Los resultados evidenciaron endosomas que contienen *M. tuberculosis*, demostrado por la expresión del autoantígeno 1 del endosoma temprano (EEA1) o la proteína de membrana 2 asociada al lisosoma (LAMP2) en los mismos compartimentos intracelulares que contenían *Mtb*-R Ags (**Fig. 11A**). Además, comparando el grado de colocalización entre las bacterias y los marcadores endosomales, encontramos un mayor grado de colocalización para LAMP2 en comparación con EEA1 (índice de colocalización de Manders de 0.93 ± 0.05 vs 0.31 ± 0.05 ; Media \pm SEM) (**Fig. 11B**). Es decir que *M. tuberculosis* se encuentra tanto en endosomas tempranos como en tardíos / lisosomas en los macrófagos humanos luego de 24 horas de estimulación, mostrando un mayor grado de colocalización con los compartimentos que caracterizan las etapas más tardías del proceso madurativo del endolisosoma.

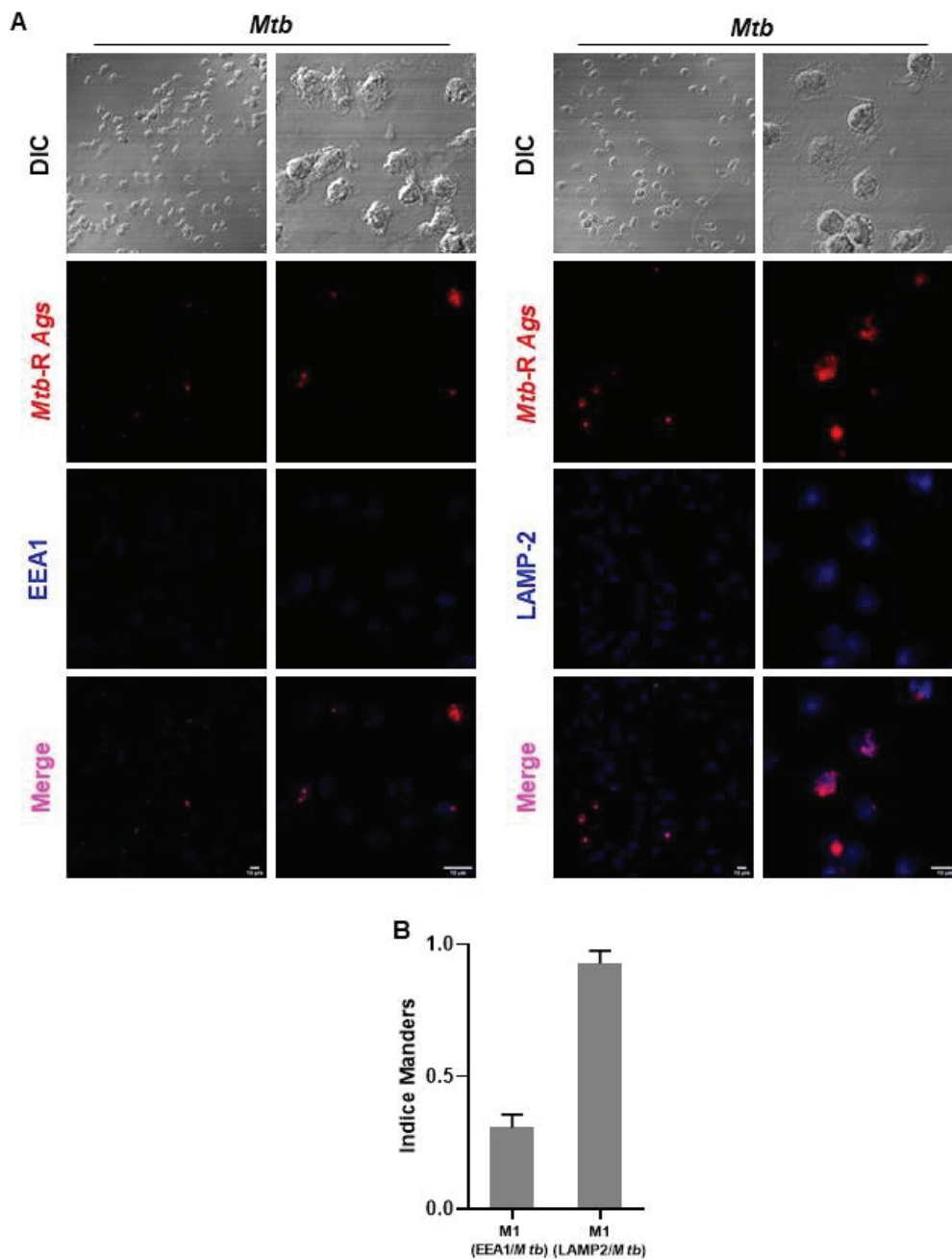
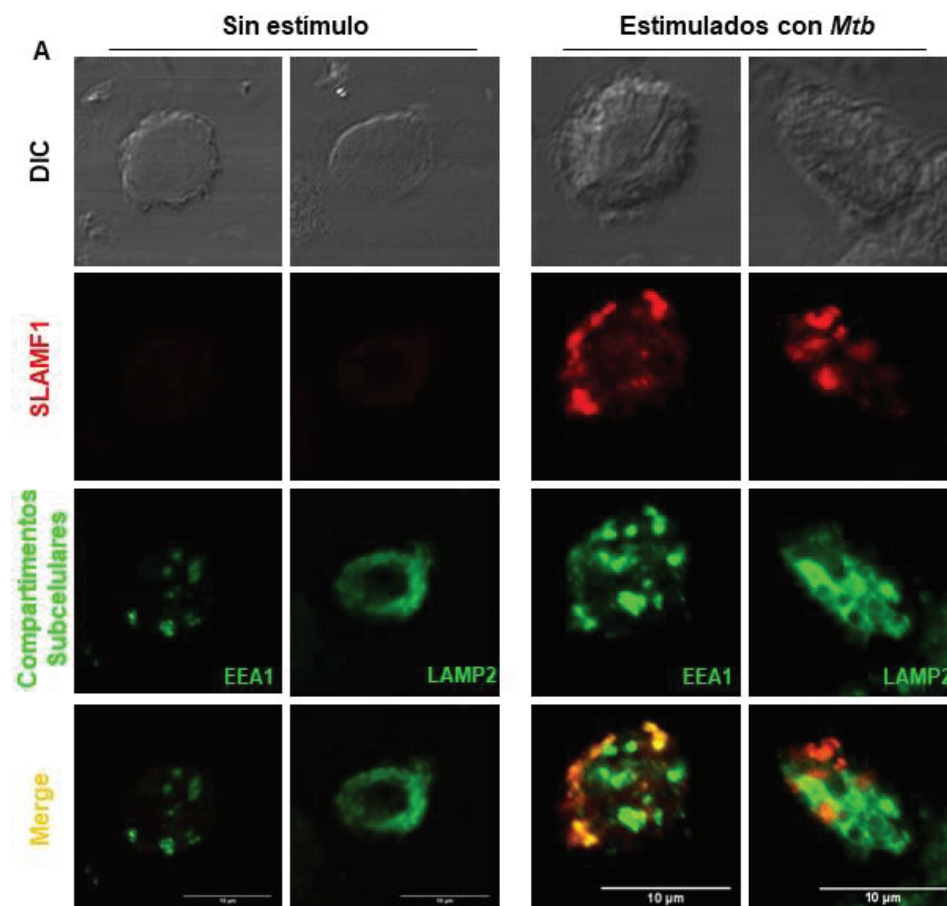


Fig. 11 Ruta de *M. tuberculosis* a través de la vía endosomal. (A) Macrófagos de dadores sanos se estimularon durante 24 horas con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (Mtb-R Ags) y la localización subcelular se determinó por microscopía confocal utilizando anticuerpos específicos de ratón para EEA1 (endosomas tempranos) o LAMP2 (endosomas / lisosomas tardíos) humanos seguidos de anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a Alexa Flúor 633 (azul). Se muestran micrografías confocales representativas para una única célula o micrografías confocales panorámicas. Ambos marcadores se detectaron después de la fijación y permeabilización de las células. DIC, contraste de interferencia diferencial. **(B)** Las barras representan la media \pm SEM del índice de Manders, donde M1 fue el coeficiente de colocalización de Manders con umbrales calculados con en el “plugin” Coloc 2 Fiji con la tinción para los marcadores endosomales como primer canal.

Finalmente, también evaluamos la colocalización de SLAMF1 con los marcadores endosomales / lisosomales tempranos y tardíos. Observamos colocalización entre SLAMF1 y ambos marcadores (EEA1 y LAMP2) en macrófagos estimulados con el sonicado de *M. tuberculosis* (Fig. 12A-B). El índice de Manders indicó que el 59.55% y 69.90% de SLAMF1 colocaliza con EEA1 y LAMP2, respectivamente. Curiosamente, más del 70% de los coeficientes de Manders calculados fueron superiores a 0,5 en ambos casos, lo que indica una colocalización marcada de los endosomas con SLAMF1 (Fig. 12C). Es importante destacar que ésta es la primera vez que se demuestra la presencia de SLAMF1 en los compartimentos endosomales. Si bien había sido propuesto el rol de SLAMF1 en la maduración del fagolisosoma en macrófagos murinos infectados con bacterias Gram negativas, estos estudios fueron realizados con ratones deficientes para SLAMF1 evaluando la cinética del fagosoma o distintas funciones fagolisosomales, por lo que la existencia de SLAMF1 en los endosomas tempranos y tardíos o lisosomas no había sido evaluada.



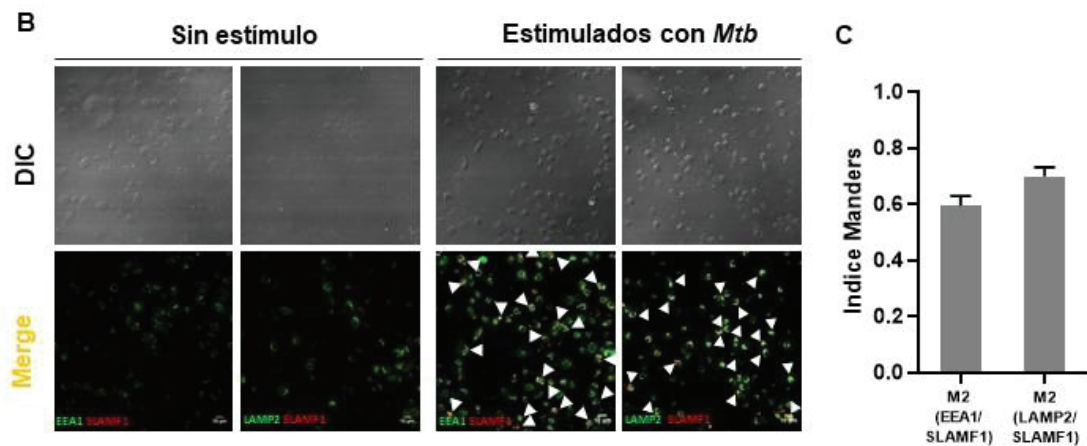


Fig. 12 Colocalización de SLAMF1 con compartimentos endosomales. Macrófagos de donadores sanos se estimularon durante 24 horas con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) sin teñir. La expresión de EEA1, LAMP2 y SLAMF1 se detectó utilizando anticuerpos específicos para estas moléculas seguidos por un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (verde) para compartimentos subcelulares o un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 546 (rojo) para SLAMF1. Los macrófagos no estimulados se usaron como control. Se muestran micrografías confocales representativas para una única célula (A) o micrografías confocales panorámicas (B). Los tres marcadores se detectaron luego de la fijación y permeabilización de las células. DIC, contraste de interferencia diferencial. (C) Las barras representan la media \pm SEM del índice de Manders, donde M2 fue el coeficiente de colocalización de Manders con umbrales calculados en el "plugin" Coloc 2 Fiji con la tinción para marcadores endosomales como primer canal.

Estos resultados respaldan nuestra hipótesis de que SLAMF1 reconoce *M. tuberculosis* en la superficie de los macrófagos, contribuye a su internalización y podría participar en el proceso de maduración de los endolisosomas para, finalmente, lograr la eliminación de este patógeno.

Tomados en conjunto, nuestros hallazgos muestran que *M. tuberculosis* induce a la expresión de SLAMF1 en macrófagos derivados de monocitos y que las interacciones homofílicas SLAMF1-SLAMF1 inducen la internalización de *M. tuberculosis*. Esta es la primera vez que se describe a SLAMF1 como un receptor capaz de reconocer *M. tuberculosis* en macrófagos humanos. Además, luego de endocitar a *M. tuberculosis*, SLAMF1 se internalizaría dentro de los macrófagos. Así, mostramos por primera vez que SLAMF1 se expresa en endosomas tempranos y en endosomas tardíos / lisosomas. Aunque todavía se requieren más estudios, estos resultados sugieren que, nuevos enfoques terapéuticos podrían dirigirse contra SLAMF1 para mejorar las funciones de los macrófagos, lo que podría conducir a la eliminación eficiente de *M. tuberculosis*.

Discusión



La Tuberculosis es una enfermedad ancestral que, aún hoy, continúa siendo un riesgo para la humanidad. Constituye un grave problema para la salud pública ya que se estima afecta latentemente entre un cuarto y un tercio de la población mundial y causa millones de muertes cada año ². No existe una vacuna completamente eficaz y aunque es prevenible y posee tratamiento, muchos pacientes abandonan la terapia y desarrollan multiresistencia a antibióticos. En Argentina, el último reporte indica un aumento en el número de muertes por Tuberculosis respecto a los años anteriores ³. Más aun, desde principios de 2020, la pandemia COVID-19 ha provocado enormes impactos sanitarios, sociales y económicos, que también afectan la epidemia de Tuberculosis. La pandemia amenaza con revertir los avances logrados hacia finales de 2019 en la lucha mundial contra la Tuberculosis, incluso, ha sido propuesto que el tratamiento y la evolución de los pacientes con Tuberculosis podrían verse comprometidos en personas con COVID-19 ².

La respuesta del hospedador frente a *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la Tuberculosis, se basa principalmente en la inmunidad celular. En este sentido, los macrófagos tienen un papel central durante el desarrollo de la Tuberculosis. Una vez en los pulmones, los macrófagos alveolares son el primer tipo celular que puede reconocer *M. tuberculosis*. Estas células tienen el potencial de eliminar las bacterias, pero también pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad, ya que constituyen el principal reservorio de este patógeno que puede sobrevivir en el interior celular ¹⁷. Dado que *M. tuberculosis* ha desarrollado múltiples formas de escapar al sistema inmune, encontrar nuevos blancos que puedan mejorar las funciones inmunológicas podría constituir una buena estrategia para combatir a este patógeno. Particularmente, terapias que apunten a inducir o reestablecer mecanismos microbicidas de los macrófagos podrían resultar prometedoras. Así, una mejor comprensión de la interacción entre *M. tuberculosis* y la respuesta inmune del hospedador resulta fundamental para delinear nuevas estrategias que lleven a una eliminación más eficiente de la bacteria.

SLAMF1 pertenece a la familia de receptores SLAM, los cuales inician distintas vías de transducción de señales en múltiples células inmunológicas innatas y adaptativas ⁹⁰. La expresión de SLAMF1 en la superficie de los macrófagos se ha descrito anteriormente en patologías inflamatorias crónicas. Sin embargo, los niveles observados de SLAMF1 dependen del contexto estudiado. Los macrófagos en el intestino inflamado de los pacientes con enfermedad de Crohn expresan, por ejemplo, altos niveles de SLAMF1, mientras que, por otro lado, se han detectado muy pocas células positivas para SLAMF1 en lesiones activas de esclerosis múltiple ⁷⁸⁻⁸⁰. En

nuestro trabajo, demostramos que la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos derivados de monocitos humanos.

Sin embargo, hemos observado que SLAMF1 se expresa en niveles muy bajos y sin diferencias significativas en macrófagos generados hacia diferentes perfiles (M1, M2a y M2c). La estimulación antigénica en estos macrófagos no indujo cambios en los niveles observados de SLAMF1. Actualmente no está claro si un macrófago, al ser estimulado, adquiere un fenotipo que conserva durante toda su vida funcional (caso en el cual existirían *in vivo* subpoblaciones de macrófagos con estados de activación definidos) o si el patrón de activación de los macrófagos cambia de manera constante de acuerdo a los estímulos que encuentren (lo que generaría un amplio rango de fenotipos no estables representantes de un continuum de activación). Aunque se habla de diferentes estados de activación, entre los que se encuentran el clásico y el alternativo, no está del todo claro cuáles son los inductores, las propiedades funcionales y el repertorio molecular de cada uno de estos grupos de macrófagos, ya que las definiciones de los diferentes fenómenos asociados a la activación varían entre los sistemas experimentales. La activación clásica (M1) del macrófago corresponde a la inducida por IFN- γ , TNF- α , o diferentes inductores como ligandos de TLR, LPS, péptidoglicano y señales endógenas^{16,91,92}. Los macrófagos M1 activados clásicamente tienen la capacidad de disparar diferentes mecanismos efectores: muerte de patógenos intracelulares, lisis de células tumorales, producción y secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α , CCL3, CXL9 y CXCL10, producción de ROS, generación de óxido nítrico, cambios fagolisosomales y aumento en la expresión de CMH II, CD86 y de la presentación antigénica asociada con células Th1. Los macrófagos M2 tienen propiedades anti-inflamatorias, inhiben la producción de IFN- γ y son inducidos por diferentes mediadores. Deben adaptarse a diferentes necesidades y situaciones *in vivo* que van desde la inducción de tolerancia hasta la regulación de la inflamación, la remoción de desechos celulares y la regeneración del tejido^{93,94}.

Aun cuando este modelo clasifica los fenotipos de activación, es importante considerar que subestima la complejidad *in vivo*, donde existe una alta diversidad de estados de macrófagos activados que emergen en respuesta a diferentes estímulos y ambientes. Por lo tanto, el estudio de la expresión de SLAMF1 en macrófagos polarizados *in vitro* debe ser explorada con mayor profundidad. Se requieren más estudios que permitan determinar el patrón de expresión en los diferentes perfiles luego de la estimulación con *M. tuberculosis*. Sería interesante evaluar si la coestimulación de SLAMF1 (o el bloqueo de la expresión de SLAMF1 utilizando ARN de interferencia) en los macrófagos estimulados con *M. tuberculosis* es capaz de modular la activación de los macrófagos hacia algún perfil determinado. Aunque en los últimos años se ha

realizado un gran esfuerzo para definir marcadores de macrófagos en humanos, todavía no existe consenso sobre cómo definir la activación de macrófagos en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Lo que se recomienda fuertemente es la descripción por parte de los grupos de investigación de las condiciones experimentales utilizadas para la generación/diferenciación y la estimulación en los experimentos con el fin de obtener un estándar experimental reproducible⁹⁵. En nuestro trabajo, hemos descrito en detalle las condiciones de obtención y cultivo de los macrófagos para lograr este objetivo.

SLAMF1 ha sido propuesto como un marcador de activación de monocitos, macrófagos y como una señal de activación de la respuesta inmune innata. En línea con esto, Farina y col., encontraron monocitos y macrófagos positivos para SLAMF1 presentes en centros germinales de muestras de amígdalas y bazo humanos⁷⁹. Además, los autores demostraron que SLAMF1 es inducido en monocitos estimulados con LPS o diferentes combinaciones de CD40L, IL-1 β e IFN- γ ⁷⁹. SLAMF1 también ha sido asociado con la activación de macrófagos humanos por Nau y col⁸¹. Apoyando nuestros hallazgos, mostraron que, entre otros receptores, los niveles transcripcionales de SLAMF1 estaban regulados positivamente en macrófagos derivados de monocitos luego de la estimulación con ciertas bacterias, incluida *M. tuberculosis*. Además, se ha demostrado que en ratones, los niveles de ARNm y proteínas de SLAMF1 también aumentan luego de la infección con *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette – Guérin (BCG) tanto *in vitro* como *in vivo*⁸². Más aun, la infección de macrófagos alveolares humanos obtenidos de donadores sanos con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* dio como resultado una regulación positiva de los niveles de ARNm de SLAMF1 en comparación con la infección producida por la cepa avirulenta H37Ra⁷⁵. En este trabajo de tesis doctoral demostramos por primera vez que la proteína SLAMF1 es inducida por *M. tuberculosis* en macrófagos derivados de monocitos humanos y células THP-1 estimuladas *in vitro*, mientras que encontramos niveles muy bajos de SLAMF1 en monocitos obtenidos de sangre periférica.

Interesantemente, la expresión de SLAMF1 ha sido propuesta como de carácter transitoria⁷⁹. Farina y col. observaron la presencia de monocitos SLAMF1 positivos al día 1 luego de la estimulación con LPS, peptidoglicano, flagelina o ácido lipoteicoico; pero la expresión de SLAMF1 desaparecía al día 2 post-estimulación⁷⁹. Nuestros resultados también apoyan la idea de una expresión transitoria de SLAMF1 en la membrana de los macrófagos. Observamos los mayores niveles de SLAMF1 a las 24 horas de estimulación antigénica con *M. tuberculosis*, los cuales comienzan a decaer a las 48 horas del cultivo *in vitro*. Más aun, en los macrófagos diferenciados hacia los diferentes perfiles clásicos y alternativos que requieren aproximadamente 7 días de

cultivo *in vitro* encontramos menos del 5% de macrófagos positivos para SLAMF1, sin diferencias en ninguno de los perfiles evaluados. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la capacidad de regular la expresión de SLAMF1 en respuesta *M. tuberculosis* esté restringida a solo una determinada población de macrófagos. Más estudios son requeridos para dilucidar qué fenómeno está operando en nuestro modelo experimental. De hecho, ha sido descrito que en fluidos pleurales de pacientes con Tuberculosis la mayoría de los monocitos/macrófagos son CD16+ ⁹⁶. Estudios recientes revelan que los monocitos CD16- son más propensos a migrar en respuesta a *M. tuberculosis*, producen más ROS y son más resistentes al patógeno, contribuyendo a la inmunidad antimicrobiana ⁹⁷. La expresión de SLAMF1 en estas poblaciones de monocitos no ha sido caracterizada, sería interesante evaluar si SLAMF1 se expresa en mayor medida en los monocitos CD16- y en qué medida los macrófagos que luego son capaces de incrementar la expresión de SLAMF1 derivan de estos monocitos.

Por otro lado, Yurchenko y col. observaron que los monocitos y macrófagos humanos en reposo expresaban SLAMF1 en el compartimento de reciclaje endocítico (por sus siglas en inglés, ERC), los cuales expresan Rab11, y mostraban una expresión débil o nula en la superficie celular. Sin embargo, después de 6 horas de estimulación con LPS, los macrófagos primarios aumentaron la expresión de SLAMF1 (50%). También observaron que SLAMF1 se relocalizó del ERC a fagosomas que contenían *E. coli* o LPS ⁹⁸, como también propusieron Berger y col ⁶⁷. Es importante destacar que, a diferencia nuestra, Yurchenko y col. obtuvieron macrófagos derivados de monocitos diferenciando células mononucleares de sangre periférica por adherencia durante 8 a 10 días en RPMI 1640 suplementado con suero humano y M-CSF. En las células THP-1, aunque diferenciadas por diferentes tiempos, los niveles encontrados para SLAMF1 fueron similares a los mostrados en nuestro trabajo. Por lo tanto, SLAMF1 podría permanecer en endosomas de reciclaje, tener una expresión transitoria en la membrana y luego regresar al compartimento intracelular. Estas observaciones están, de hecho, en consonancia con la hipótesis del papel de SLAMF1 como sensor microbiano. Para lograr esta función, SLAMF1 debe expresarse transitoriamente en la superficie celular para interactuar con los antígenos de *M. tuberculosis* y mediar la endocitosis de la bacteria, llevándola al compartimento endosomal e induciendo la maduración del endosoma.

Al evaluar si otros estímulos eran capaces de regular la expresión de SLAMF1, también observamos que este receptor fue inducido en macrófagos humanos de donadores sanos después del tratamiento *in vitro* con IFN- γ humano recombinante pero no por IL-4 o IL-10. En contraste con nuestros hallazgos, Farina y col. propusieron que SLAMF1 está relacionado con la infección bacteriana, pero no necesariamente con la inflamación, ya que SLAMF1 es inducido por los

ligandos TLR-2, 4 y 5, pero no por IFN- γ en los monocitos ⁷⁹. En otro trabajo, Castillo-Velázquez y col. mostraron que los macrófagos derivados de monocitos de ganado adulto tratados con IL-4 expresaban menores niveles de ARNm de SLAMF1 respecto a las células clásicamente activadas⁸⁸. SLAMF1 también fue uno de los ocho inmunorreceptores que se encontró sobreexpresado en CDs tratadas con IL-10 ⁹⁹. Además, McBride y col. demostraron un aumento en los niveles de ARNm y de proteína SLAMF1 cuando las CDs se cultivaron en presencia de LPS e IL-10 en comparación con LPS solo ¹⁰⁰. En conclusión, los reportes anteriores junto con nuestros resultados sugieren un patrón complejo de regulación de la expresión SLAMF1 en las células inmunes innatas, que depende del tipo de célula, del tipo de estímulo y del microambiente. Un dato relevante que surge de nuestro trabajo es que la expresión incrementada de SLAMF1 en macrófagos estimulados con *M. tuberculosis* no es producto de un efecto bystander. Es decir que los mediadores solubles presentes en los sobrenadantes de cultivo no son los responsables del incremento de los niveles de SLAMF1, sino que la interacción con la bacteria es necesaria para modular los niveles de SLAMF1 en la superficie de los macrófagos.

Previamente, fue demostrado por miembros de nuestro equipo que SLAMF1 media las respuestas inmunes protectoras adaptativas durante la Tuberculosis al inducir respuestas Th1 ^{50,101,102}. Por otro lado, se han descrito varios roles en las funciones de macrófagos para SLAMF1 ^{66–68,82,103–106}. La presencia de SLAMF1 en macrófagos se ha asociado con la producción de citoquinas inflamatorias como TNF- α e IL-12 y de ROS en respuesta a LPS ⁶⁶, con la regulación de la enzima NADPH oxidasa, la fusión de membranas y la maduración del fagolisosoma ^{67,103}, con la activación de la vía de NF- κ B y la eliminación de BCG ⁸³, con la modulación de la vía TLR4-TRAM-TRIF ⁹⁸ y con el reclutamiento de células inflamatorias a tejidos inflamados ^{104,105}. Por otra parte, SLAMF1 se ha propuesto como una molécula que promueve la replicación intracelular de parásitos en CDs y macrófagos ^{68,69}. Sin embargo, el papel de SLAMF1 como regulador de las funciones de los macrófagos durante la Tuberculosis no había sido explorado previamente. Aunque se requieren estudios más profundos, nuestros resultados indican que SLAMF1 podría estar actuando en el sitio de la infección, ya que la expresión de este receptor aumenta en las células CD14 positivas de derrames pleurales en comparación con las células CD14 positivas provenientes de sangre periférica de pacientes con Tuberculosis activa.

Curiosamente, un trabajo reciente ¹⁰⁷ demostró que la mayoría de los macrófagos de las vías respiratorias humanas derivan de monocitos reclutados de sangre periférica durante condiciones fisiológicas normales. Además, los autores también demostraron que durante el envejecimiento, el fenotipo de estas dos poblaciones es muy similar, lo que demuestra que las poblaciones de

macrófagos alveolares pueden ser considerablemente más dinámicas y menos estables que lo reportado durante el estudio de la ontogenia murina ¹⁰⁷. Mediante el uso de muestras de lavado broncoalveolar de pacientes con trasplante de pulmón, mostraron que la mayoría de los macrófagos alveolares en el pulmón humano después del trasplante derivan del receptor, lo que demuestra el papel fundamental de los macrófagos alveolares de origen periférico en la salud pulmonar humana ¹⁰⁷. Por lo tanto, en los pacientes con Tuberculosis activa, las células CD14 positivas circulantes podrían estar migrando al pulmón durante el curso de la infección. Una vez que se encuentran con los antígenos de *M. tuberculosis*, tanto de bacilos vivos como de partículas antigénicas liberadas por micobacterias o incluso células necróticas infectadas, las células CD14 positivas podrían aumentar la expresión de SLAMF1. Sin embargo, también podría ser posible que los patrones de expresión de SLAMF1 difieran entre las dos poblaciones de células CD14 positivas estudiadas en nuestro trabajo. De hecho, se han informado anteriormente diferencias en los perfiles de expresión de genes y proteínas de monocitos, macrófagos derivados de monocitos y macrófagos de las vías respiratorias en ratones, bovinos y humanos ¹⁰⁸⁻¹¹². Algunos de estos estudios, mediante microarrays o enfoques de transcriptómica, evidencian diferencias en la expresión de citoquinas, moléculas asociadas al CMH, factores de transcripción, metalopeptidasas de matriz, quemoquinas y receptores de quemoquinas e integrinas ^{107,109-111}. También se han observado distintos niveles de TLRs, particularmente TLR2, 4 y 9 los cuales están involucrados en el reconocimiento de *M. tuberculosis* ¹¹⁰.

Como hemos mencionado previamente, numerosos estudios demuestran el rol de SLAMF1 en la regulación de muchos mecanismos celulares que incluyen poblaciones inmunes innatas y adaptativas ^{56,90,113,114}. En este trabajo de tesis doctoral exploramos el rol de SLAMF1 como regulador de las funciones de los macrófagos durante la infección por *M. tuberculosis*. En primer lugar, evaluamos la secreción de TNF- α y de IL-1 β por las células THP-1 estimuladas por *M. tuberculosis* en presencia de un anticuerpo agonista para SLAMF1 (α -SLAMF1, A12). El papel de SLAMF1 en la producción de citoquinas por las CPA es controversial. Aunque se ha demostrado que SLAMF1 puede inducir la producción de IL-12 y CXCL8 por CDs estimuladas con LPS ¹¹⁵, un trabajo posterior mostró que las interacciones SLAMF1-SLAMF1 entre las células regulan negativamente la producción de IL-12, IL-6 y TNF- α por CDs activadas mediante CD40L ¹¹⁶. En macrófagos murinos estimulados con LPS más IFN- γ , la ausencia de SLAMF1 redujo los niveles de TNF- α e IL-12, así como la producción de NO ⁶⁶, mientras que la estimulación con LPS en macrófagos deficientes para SLAMF1 aumentó la producción de IL-6 ⁶⁶. Por otra parte, en la línea celular macrofágica murina RAW264.7 infectada con BCG y en el líquido proveniente de lavados broncoalveolares de ratones infectados *in vivo*, la sobreexpresión de SLAMF1 aumentó los niveles

de MCP-1, TNF- α e IL-1 β y disminuyó la producción de IL-6⁸². Estos trabajos previos evidencian que SLAMF1 puede modular la producción de citoquinas y quemoquinas en CD5 y poblaciones de macrófagos. Sin embargo, aunque con nuestros experimentos demostramos que el sonicado de *M. tuberculosis* fue capaz de inducir la producción de TNF- α e IL-1 β por las células THP-1, no encontramos diferencias en los niveles secretados de estas citoquinas cuando las células se cultivaron en presencia del anticuerpo agonista anti-SLAMF1. Por lo tanto, SLAMF1 no modula los niveles de producción de estas citoquinas proinflamatorias inducidos por *M. tuberculosis* en nuestro modelo de estudio. SLAMF1 podría regular la secreción de otras citoquinas, tanto positiva como negativamente o incluso la producción de TNF- α e IL-1 β en diferentes tiempos a los estudiados. La elección de los tiempos para determinar los niveles de TNF- α y de IL-1 β se realizó en base a estudios de cinéticas en monocitos/macrófagos previos. En estos estudios se observó que la máxima expresión de TNF- α ocurre alrededor de las 4 horas mientras que la de IL-1 β es a las 24 horas de cultivo^{117,118}. También se ha demostrado que el momento de máxima inducción del ARNm de TNF- α en macrófagos alveolares humanos fue 24 horas después de la infección por *M. tuberculosis*¹¹⁹. Otro trabajo reveló que la respuesta de IL-1 β específica de macrófagos difiere entre los pacientes con Tuberculosis activa, los individuos con Tuberculosis latente y los controles no infectados. En este caso, la expresión génica y proteica de IL-1 β (y también de TNF- α aunque no mostró cambios entre los diferentes grupos) en macrófagos derivados de monocitos humanos fue evaluada a las 6 y 24 horas después de la estimulación *ex vivo* por antígenos específicos de *M. tuberculosis*¹²⁰. Teniendo en cuenta estos trabajos previos, decidimos evaluar la producción de TNF- α e IL-1 β a las 4 y 24 horas después de la estimulación con el sonicado de *M. tuberculosis*, lo que debería cubrir los tiempos de máxima acumulación de estas citoquinas en los sobrenadantes del cultivo. Cabe señalar que ambas citoquinas se detectaron en todas las condiciones de cultivo, tanto a las 4 como a las 24 horas. Con respecto a TNF- α , mostramos que los niveles secretados eran mayores a las 4 horas en comparación con las 24 horas. Para la IL-1 β , observamos los niveles más altos en los sobrenadantes de cultivo a las 24 horas luego de la estimulación. Aunque en este caso no podemos establecer si los niveles máximos fueron o no alcanzados a las 24 horas, es importante destacar que a lo largo de nuestro trabajo no se realizó ningún otro experimento más allá de las 24 horas de cultivo. Independientemente del tiempo de estimulación, observamos que SLAMF1 no indujo la producción de estas citoquinas.

Los macrófagos también exhiben la extraordinaria capacidad de reconocer patógenos y fagocitarlos. La fagocitosis inicia la respuesta inmune innata, lo que a su vez orquesta la respuesta adaptativa. Para discriminar entre agentes infecciosos y antígenos propios, los macrófagos disponen de receptores de reconocimiento, algunos de los cuales son capaces de mediar la

fagocitosis, induciendo cambios en el citoesqueleto de actina y permitiendo la internalización de los patógenos. En la infección por *M. tuberculosis* se han implicado una gran cantidad de receptores macrofágicos involucrados en la unión e internalización de la bacteria, siendo los receptores del complemento, los TLR y el receptor de manosa unos de los más estudiados ¹²¹. Para probar si SLAMF1 está involucrado en la internalización de *M. tuberculosis* en los macrófagos, empleamos el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina para estimular los macrófagos derivados de monocitos y las células THP-1 y evaluar la internalización de antígenos por citometría de flujo. Observamos un mayor número de células que interactuaron con *M. tuberculosis* cuando agregamos al cultivo el anticuerpo agonista para SLAMF1 (α -SLAMF1). La asociación entre SLAMF1 y el proceso fagocítico se ha evaluado anteriormente. A diferencia de nuestros resultados, Wang y col. no encontraron diferencias en la tasa de fagocitosis de *E. coli* en macrófagos peritoneales de ratones deficientes para SLAMF1 ⁶⁶. Por el contrario, Berger y col. mostraron que la fagocitosis de *E. coli*, pero no de *S. aureus*, se vio retrasada en macrófagos primarios murinos que no expresaban SLAMF1 ⁶⁷. Es importante destacar que todos estos estudios fueron realizados en ratones y evaluaron la función de SLAMF1 frente a bacterias Gram negativas, mientras que nuestro trabajo se basa en macrófagos humanos frente a una bacteria no clasificable según la tinción de Gram (debido a la presencia de los ácidos micólicos en su pared) pero que comparte características tanto con aquellas Gram positivas como Gram negativas ¹²². Además, demostramos una mayor interacción entre macrófagos y *M. tuberculosis* por microscopia confocal. Observamos que la activación de SLAMF1 mediada por el agregado del anticuerpo agonista para SLAMF1 condujo a una mayor internalización de antígenos detectados por una mayor proporción de células rodamina positivas. Este resultado fue reforzado al infectar células THP-1 con *M. tuberculosis* viva fluorescente (*Mtb*-RFP), observándose una mayor proporción de infección cuando las células fueron cultivadas en presencia de α -SLAMF1.

Interesantemente, si bien el IFN- γ fue capaz de inducir los niveles de SLAMF1, no observamos cambios en los niveles de internalización del sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina cuando los macrófagos derivados de monocitos y las células THP-1 fueron cultivadas con esta citoquina. En concordancia con nuestros resultados, Castaño y col. propusieron que macrófagos derivados de monocitos expuestos a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* no responden al tratamiento con IFN- γ , ya que al evaluar las unidades formadoras de colonia no encontraron diferencias significativas entre las células tratadas y las células control ¹²³. Por otro lado, Khan y col. observaron que el tratamiento con IFN- γ en macrófagos provenientes de pacientes con Tuberculosis no modifica la capacidad fagocítica, pero si disminuye la replicación intracelular de la bacteria ¹²⁴. Sin embargo, en otro trabajo fue demostrado que el bloqueo de PD-1 y PD-L en

cocultivos de células T y macrófagos derivados de monocitos (lo cual favorecería la producción de IFN- γ) incrementaba tanto la fagocitosis como el poder bactericida de los macrófagos frente a la infección por BCG ¹²⁵. Nuestros resultados podrían indicar que la regulación del proceso endocítico por SLAMF1 ocurre específicamente cuando existe una interacción homofílica SLAMF1-SLAMF1.

Es importante destacar que los efectos que observamos a lo largo de nuestro trabajo al utilizar el anticuerpo agonista para SLAMF1 (α -SLAMF1, A12) no se deben a cambios en la viabilidad de las células. Hemos empleado un colorante de viabilidad (FVD eFluor780) que marca irreversiblemente las células muertas y permite excluirlas de los análisis, así como también permite detectar el número de células viables. La viabilidad celular fue en todos los casos superior al 90% y no observamos diferencias significativas al tratar los macrófagos con el anticuerpo α -SLAMF1.

Teniendo en cuenta las observaciones anteriores, nos preguntamos si SLAMF1 inducía la endocitosis debido a que es capaz de reconocer a *M. tuberculosis* o debido a que SLAMF1 es capaz de modular la expresión de otras moléculas que contribuyen con la internalización de la bacteria; o incluso ambas posibilidades. Trabajos anteriores han demostrado el papel de SLAMF1 como un sensor microbiológico que reconoce patrones moleculares de virus y bacterias Gram negativas, lo que indica que SLAMF1 podría estar actuando como un receptor de reconocimiento de patrones que reconoce directamente algún antígeno de *M. tuberculosis* e induce su internalización. El dominio IgV de SLAMF1 participa en la entrada del virus del sarampión a las células, incluso si se transfecta en células que normalmente no expresan SLAMF1 ⁷⁰ y, como fue mencionado anteriormente, también reconoce las proteínas de membrana externa OmpC y OmpF de *E. coli* ⁶⁷ y Omp25 de *B. abortus* ⁷³. Nuestros resultados sugieren que SLAMF1 puede detectar a *M. tuberculosis* según lo determinado por la fuerte colocalización observada entre la bacteria y SLAMF1 por microscopia confocal y evidenciado por el índice de Manders, tanto del sonicado ($> 0,74$) como de las células enteras de *M. tuberculosis* ($> 0,90$). Además, demostramos la existencia de interacción bioquímica entre SLAMF1 y *M. tuberculosis* mediante dos estrategias metodológicas diferentes: citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Nuevamente, tanto el sonicado como las células enteras de la bacteria mostraron interacción con SLAMF1, indicando que algún antígeno presente en la superficie de *M. tuberculosis* es el reconocido por SLAMF1. Se ha descrito que *M. tuberculosis* posee proteínas Omp en su pared celular ¹²⁶⁻¹²⁹. Estas proteínas podrían estar involucradas en el reconocimiento mediado por SLAMF1, sin embargo se requieren más para confirmar esta hipótesis. Además, proponemos que en los macrófagos SLAMF1 puede

desempeñar una doble función como molécula coestimuladora y como sensor microbiológico para *M. tuberculosis*. Curiosamente, ha sido sugerido que la interacción de SLAMF1 con las bacterias involucra un dominio diferente al que participa en las interacciones homófilas SLAMF1-SLAMF1 o SLAMF1-virus y, por lo tanto, puede tener un origen distinto y representar una función de SLAMF1 de origen evolutivo separado ⁸⁹.

Por otro lado, apoyando la idea de una interacción directa entre SLAMF1 y las proteínas Omp, Degos y col. ⁷³ utilizaron células COS-7 (línea celular similar a fibroblastos de riñón de mono verde africano) transfectadas con un plásmido que codifica únicamente para el dominio extracelular de SLAMF1. Purificaron SLAMF1 a partir de extractos de proteína de las células COS-7 y luego los incubaron con la proteína Omp25 de *B. abortus* para analizar la interacción por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-Omp25. Demostraron que el dominio extracelular de SLAMF1 precipitaba con Omp25. También demostraron que esto era específico para Omp25 y no para Omp19 o incluso para CD90, otro miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. También realizaron experimentos con ratones deficientes para SLAMF1 y cepas de *B. abortus* salvajes o mutantes para Omp25 para estudiar la interacción Omp25-SLAMF1 en CDs de ratón. Además, el trabajo de Berger y col. ⁶⁷ también mostró evidencia convincente de una interacción directa entre SLAMF1 y Omp de *E. coli* y *S. typhimurium* SseB-. Utilizaron diferentes enfoques, incluidos ratones deficientes para SLAMF1, un ensayo de amplificación con la línea celular de células T Jurkat y macrófagos RAW264.7 que expresaban SLAMF1-mCherry fluorescente. Por lo tanto, existe evidencia previa bibliográfica y en nuestro trabajo para apoyar la hipótesis de la interacción entre SLAMF1 y *M. tuberculosis*. Finalmente, consideramos que una característica importante de nuestros ensayos de interacción bioquímica, que hace que nuestros resultados sean robustos, es que encontramos una interacción bioquímica al utilizar macrófagos sin ninguna modificación transgénica (SLAM no fue sobre-expresado) y la misma proporción células:bacterias que la utilizada para todos los ensayos *in vitro* desarrollados en este trabajo.

Por otro lado, también podríamos especular que SLAMF1 forma parte de un complejo de proteínas que interacciona con *M. tuberculosis*. De hecho, esto ocurre para otro miembro de la familia SLAM, SLAMF7. SLAMF7 requiere de la expresión de la integrina Mac-1 y depende de la contribución de FcRγ y DAP12 para fagocitar células tumorales ¹³⁰. Los autores observaron que los inmunoprecipitados de SLAMF7 contenían dos proteínas de la familia de las integrinas, la subunidad α de CD11b (αM) y la subunidad β de CD18 (β2), que constituyen Mac-1. Sin embargo, también realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-CD11b y demostraron que esos inmunoprecipitados no contenían SLAMF1 ni ningún otro receptor de la

familia SLAM que no fuese SLAMF7. Como en este trabajo no hemos realizado ensayos de inmunoprecipitación o enfoques similares que nos permitan saber si SLAMF1 requiere alguna otra molécula para interactuar con *M. tuberculosis* y modular el proceso endocítico, no podemos descartar esta hipótesis. Sin embargo, aunque esta es una función muy interesante para SLAMF7, es importante resaltar que los autores realmente demostraron que esto no ocurre para SLAMF1 y que los experimentos se realizaron con células tumorales hematopoyéticas que también expresaban SLAMF7 en su membrana.

Después de la absorción de los microorganismos, los macrófagos destruyen los patógenos dentro del fagolisosoma. Luego del reconocimiento antigénico, los receptores fagocíticos inician cascadas de señalización que remodelan la membrana celular y regulan el citoesqueleto de actina con el fin de extender la membrana celular alrededor de su target. Los receptores fagocíticos participan en un orden secuencial y cooperan para completar la formación del fagosoma. Una vez que la partícula se internaliza dentro del fagosoma temprano, esta vacuola puede fusionarse con vesículas provenientes del retículo endoplásmico y el complejo de Golgi para formar un fagosoma intermediario que, más tarde, se convertirá en una vacuola microbicida, el fagolisosoma, al fusionarse con los lisosomas. En este proceso madurativo, el fagosoma se vuelve cada vez más ácido por la acción de una V-ATPasa que bombea protones y por el reclutamiento de varias enzimas degradativas. La composición de la membrana también cambia para incluir moléculas que controlan la fusión de la membrana, como las GTPasas Rab. El endosoma temprano puede unirse a endosomas de reciclaje y adquiere un pH de alrededor de 6.1-6.5 pero no resulta muy destructivo. Estos eventos son regulados por la GTPasa Rab5, la cual también es requerida para la transición de endosoma temprano a tardío. Esta proteína recluta a EEA1 (autoantígeno 1 del endosoma temprano) que funciona como un puente que une los endosomas tempranos a las vesículas endocíticas entrantes. A medida que avanza la maduración, Rab5 se pierde y Rab7 aparece en la membrana para formar los fagosomas intermedios, etapa en la cual se eliminan del fagosoma las proteínas que serán recicladas o degradadas. Posteriormente, con la constitución del fagosoma tardío, se logra una mayor acidificación (pH 5.5-6), se reclutan proteínas de membrana asociadas al lisosoma (LAMP) y proteasas como catepsinas e hidrolasas y ocurre la fusión con los lisosomas. Los fagolisosomas son los compartimentos microbicidas definitivos, altamente ácidos (pH de hasta 4.5) y se caracterizan por la presencia de múltiples enzimas hidrolíticas, V-ATPasas y NADPH oxidasas ¹³¹.

Como observamos que SLAMF1 fue capaz de reconocer *M. tuberculosis* y facilitar su entrada en los macrófagos, decidimos evaluar si SLAMF1 es capaz de ingresar a los endosomas y si participa

en los pasos de maduración del compartimento endolisosomal. EEA1 y las proteínas LAMP han demostrado ser útiles como marcadores endosómicos / lisosómicos tempranos y tardíos, respectivamente ^{38,132-134}. El reclutamiento de EEA1 es un evento esencial para la maduración del fagosoma. *M. tuberculosis* tienen el potencial de inhibir la adquisición de esta proteína ^{20,21} evitando el aumento de Ca^{2+} ¹³⁵. También se ha demostrado que la estimulación de las vías de la MAPK p38 en las células BHK (línea celular de riñón de hámster) y los macrófagos contribuye a la detención de la maduración de fagosomas que contienen *M. tuberculosis* al eliminar Rab5 de la membrana ³⁹ o al bloquear la actividad de Rab5 mientras está en la membrana ³⁸, lo que a su vez culmina con la inhibición del reclutamiento de EEA1. Luego de la formación del endosoma temprano, las proteínas LAMP que se requieren para la fusión de fagosomas con lisosomas son reclutadas ²². La expresión de LAMP es variable entre las células infectadas por *M. tuberculosis*. LAMP-1 es acumulado por fagosomas de macrófagos infectados con *M. avium* ¹³⁶ mientras que LAMP-1 y -2 están más marcadas dentro de los fagosomas que contienen *M. tuberculosis* muerta en comparación con los que contienen bacterias vivas ¹³⁷. Los endosomas que contienen BCG también muestran niveles bajos de LAMP-1 y -2 ¹³⁸.

Curiosamente, se ha demostrado previamente un papel positivo de SLAMF1 en la progresión de la maduración fagolisosómica ⁶⁷. En consecuencia, decidimos evaluar si SLAMF1 ingresa en los endosomas tempranos y tardíos que contienen *M. tuberculosis* por microscopía confocal. Primeramente, observamos que *M. tuberculosis* colocalizó con ambos marcadores endosomales estudiados (EEA1 y LAMP-2). De hecho, el sonicado de *M. tuberculosis* mostró una mayor localización en endosomas tardíos/lisosomas a las 24 horas de estimulación como lo refleja el índice de Manders (0.31 para EEA1 y 0.93 para LAMP2). Un resultado llamativo fue que encontramos a SLAMF1 localizado tanto en endosomas tempranos como en endosomas tardíos/lisosomas, lo que sugiere la participación de SLAMF1 en el proceso de maduración endolisosomal. Nuestros resultados constituyen la primer evidencia de la expresión de SLAMF1 dentro de los compartimentos endosomales. Al evaluar el grado de colocalización, detectamos que SLAMF1 colocalizaba en mayor medida con endosomas tardíos/lisosomas a las 24 horas post-estimulación, de la misma manera que lo observado para hizo *M. tuberculosis*.

Aunque SLAMF1 se ha propuesto como un blanco terapéutico en otras enfermedades inflamatorias e infecciosas ^{68,139}, su papel en las respuestas inmunes es complejo y aún no es bien comprendido. A pesar de nuestros hallazgos, se requieren más estudios sobre los mecanismos microbicidas, así como el impacto de SLAMF1 en otras poblaciones celulares para una mejor comprensión de las funciones de esta proteína en los macrófagos durante la infección por *M.*

tuberculosis. Como la inhibición de la degradación de *M. tuberculosis* dentro de los fagosomas es una estrategia de escape para evitar la apoptosis y promover la necrosis y diseminación¹⁴⁰, evaluar el impacto de SLAMF1 en la eliminación de *M. tuberculosis* sería un enfoque muy interesante.

En resumen, hemos contribuido a comprender el papel de SLAMF1 en los macrófagos. Pusimos de manifiesto que *M. tuberculosis* induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos y que SLAMF1 es capaz de inducir la interacción entre estas células y las bacterias sin efecto en la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β . Es importante destacar que SLAMF1 reconoce *M. tuberculosis* y contribuye al proceso de maduración del endolisosoma una vez que las bacterias se encuentran dentro de la célula. Tomados en conjunto, estos resultados proporcionan la primera evidencia de SLAMF1 como un posible sensor microbiológico y regulador de las funciones de los macrófagos contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Este trabajo permite, además, sentar las bases que nos permitirán dilucidar la función de SLAMF1 en pacientes con Tuberculosis latente y activa. Resultados previos demuestran que aquellos pacientes con mayor severidad de la enfermedad expresan menores niveles de SLAMF1 en las células T. Por lo tanto, se podría esperar deficiencias en la expresión de SLAMF1 y por consiguiente en algunas de sus funciones. La modulación de SLAMF1 podría llevar a un mayor control de la bacteria impactando no sólo en la respuesta inmune innata sino en la generación de una respuesta inmune adaptativa más eficiente frente al patógeno.

Capítulo Dos. INFECCION POR

Clostridioides difficile

Abreviaturas



CDs	Células dendríticas
CDI	Infección por <i>Clostridioides difficile</i>
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de EEUU
CDT	Toxina binaria de <i>C. difficile</i>
Cwps	proteínas de la pared celular
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de EEUU
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMT	Trasplante de materia fecal
GTPasas	guanosin trifosfatasa
IBD	enfermedad inflamatoria intestinal
IECs	células epiteliales intestinales
ILCs	células linfoides innatas
MIP-1a, 2	proteína inflamatoria de macrófagos -1a, -2
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
PaLoc	locus de patogenicidad
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
ROS	intermediarios reactivos del oxígeno
SLAM (F1-9)	Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (Miembro Familiar 1-9)
SLPs	proteínas de la capa superficial
tcdA	Toxina A de <i>C. difficile</i>
tcdB	Toxina B de <i>C. difficile</i>

Introducción



INFECCION POR *Clostridioides difficile*. Historia y epidemiología

La infección por *Clostridioides difficile* (CDI, por sus siglas en inglés) es la causa más común de diarrea infecciosa nosocomial y generalmente se desarrolla luego del uso de antibióticos que provocan disbiosis de la microbiota intestinal ¹⁴¹. La amoxicilina-clavulánico, cefalosporinas, clindamicina y quinolonas son los antibióticos comúnmente más asociados, pero, prácticamente cualquier antibiótico puede dar lugar a la CDI. La hospitalización, la residencia en instituciones de cuidados crónicos y la colonización ambiental son otros factores de riesgo importantes, al igual que la edad (> 65 años), la inmunosupresión, la insuficiencia renal y otras comorbilidades ¹⁴². Los síntomas clínicos de la CDI varían desde una diarrea leve a una colitis pseudomembranosa o megacolon tóxico (intestino groseramente dilatado), perforación intestinal, sepsis y shock séptico, con una mortalidad global en pacientes hospitalizados estimada en un 9% ¹⁴³.

La práctica estándar para el tratamiento de esta enfermedad consiste en la administración de antibióticos que producen una disrupción de la flora microbiana, creando un nicho para CDI adicionales. Por lo tanto, generar nuevas estrategias terapéuticas resulta sumamente necesario. Los antibióticos actualmente disponibles que se recomiendan para el tratamiento son metronidazol, vancomicina y fidaxomicina. Existen pruebas limitadas que apoyan el uso de probióticos para disminuir la recurrencia de CDI y, por otro lado, el trasplante de microbiota fecal (FMT, por sus siglas en inglés) es un tratamiento altamente efectivo que suele considerarse en pacientes que han tenido más de 2 recurrencias (ya que la eficacia de los antibióticos en estos pacientes es de aproximadamente un 30%) ¹⁴⁴. Las inmunoterapias representan un método atractivo para combatir la epidemia de la CDI, sin embargo, aún se conoce poco acerca de la respuesta inmune generada durante las distintas etapas de esta enfermedad.

Actualmente, la CDI se ubica por encima de la infección causada por *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA, por sus siglas en inglés) ¹⁴⁵, constituyéndose como la principal causa de infección intrahospitalaria en los Estados Unidos. Casi medio millón de estadounidenses están infectados con *C. difficile*, causando 29.300 muertes por año ¹⁴⁶. Por otro lado, el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés) estimó que 152.905 personas enferman de CDI, provocando 8382 muertes anuales ^{147,148}. Sin embargo, la epidemiología de la CDI en países en vías de desarrollo se encuentra subestimada debido a las diferencias y limitaciones en la política, los recursos de diagnóstico y protocolos de vigilancia ¹⁴⁹. En Argentina, sólo se dispone de escasos datos sobre la incidencia y la prevalencia de *C. difficile* como causa de diarrea. Fernández Canigia y col. reportaron en el año 2001 una prevalencia de CDI del 6,5% ¹⁵⁰. En un estudio de un año realizado en 2003 con pacientes sintomáticos en el

hospital general Tornú, Legaria y col. observaron una frecuencia de CDI del 36,8% ¹⁵¹. Mientras que, en un estudio multicéntrico realizado en un hospital terciario de Argentina y 3 de México, la incidencia general detectada fue de 1,1 por 1000 pacientes ¹⁵². Estos estudios demuestran que los datos sobre la frecuencia y la relevancia de la CDI en nuestro país no son solamente escasos sino también heterogéneos.

La epidemiología de la CDI ha sufrido importantes cambios en la última década, evidenciados por un aumento en incidencia, gravedad, frecuencia de recurrencias y complicaciones asociadas a la CDI a nivel mundial ¹⁵³. Respecto a esto, una característica sorprendente de la CDI, es la alta tasa de recurrencia. Entre el 18% y el 35% de las personas tratadas por CDI experimentan al menos 1 episodio adicional de CDI dentro de las 2 a 8 semanas de la CDI inicial ¹⁵⁴. Los episodios subsecuentes pueden clasificarse como recidivas si se trata de la misma cepa de *C. difficile* o reinfección si se trata de una nueva cepa ^{146,155}. Un estudio retrospectivo realizado en Corea demostró que aproximadamente la mitad de los episodios consecutivos de CDI eran debido a recidivas con el mismo ribotipo de *C. difficile* y la otra mitad eran reinfecciones con un ribotipo diferente ¹⁵⁶. El intervalo de la recurrencia fue menor en el grupo de individuos con recidiva, mayormente representadas por los ribotipos 017 y 018; mientras que un número mayor de pacientes con re-infección requirieron de hospitalización ¹⁵⁶. Otro estudio realizado en Suiza encontró que el 65% de los segundos episodios correspondieron a recidivas ¹⁵⁷. Aunque una proporción considerable de estos episodios recurrentes se producen después de la re-exposición a antimicrobianos sistémicos, la recurrencia es común, incluso sin una exposición directa a la bacteria ¹⁵⁸.

Los cambios en la epidemiología vinieron acompañados de la aparición de una cepa hipervirulenta (NAP1/BI/027) en América del Norte en los años 2000, asociada con una mayor morbilidad y mortalidad, que se extendió a otros países y causó brotes a escala mundial en Europa, Asia y Australia ¹⁵⁹. La detección de esta cepa hipervirulenta en Latinoamérica algunos años después destaca el problema y la facilidad de diseminación de *C. difficile* en todo el mundo ¹⁶⁰.

Entre los pacientes hospitalizados, la tasa de colonización aumenta rápidamente de 13% para los pacientes hospitalizados de 1-2 semanas a 50% para los pacientes hospitalizados por más de 4 semanas ¹⁶¹. Si bien la colonización de adultos sanos y ambulatorios con *C. difficile* es infrecuente, el número de CDI adquiridas en la comunidad ha incrementado en pacientes previamente considerados como de bajo riesgo, como mujeres jóvenes o individuos sin exposición previa a antibióticos ^{162,163}. Curiosamente, en Argentina, el 15% de los casos de CDI se detectaron en

pacientes ambulatorios que presentaban diarrea, destacando el problema de la adquisición comunitaria de *C. difficile* ¹⁵¹. Además, *C. difficile* ha sido identificada en animales de ganado, productos cárnicos, mariscos y ensaladas, y existe una dispersión ambiental generalizada de esporas de *C. difficile* que son reservorios potenciales para la CDI adquirida en la comunidad ^{164,165}. *C. difficile* también se encuentra como microorganismo comensal o patogénico en el tracto intestinal de la mayoría de los mamíferos, evidencia que apunta a un potencial zoonótico de esta bacteria ^{165,166}.

El aumento de la incidencia y la gravedad de la infección por *C. difficile* ha llevado a una carga económica importante en los sistemas de salud debido a los costos asociados con el tratamiento y las estadías prolongadas de los pacientes en los centros sanitarios. Los pacientes que presentan recurrencia están expuestos a repetidos y prolongados ciclos de antimicrobianos, frecuentes visitas clínicas y hospitalizaciones, desnutrición y frustración. El aumento de la presión sobre los hospitales para el alta hospitalaria podría contribuir con la diseminación de la bacteria al aumentar la circulación de cepas en la comunidad. Una mirada más profunda de datos epidemiológicos en nuestro país, así como también estudios que focalicen en métodos de prevención resultan de suma urgencia. Algunos mecanismos potenciales para explicar la susceptibilidad a la CDI recurrente incluyen la interrupción persistente de diversidad de la microbiota ¹⁶⁷ y fallas en las respuestas inmunes del hospedador ¹⁶⁸. Por lo tanto, una mejor comprensión de los mecanismos inmunes puestos en marcha durante la CDI y de la interrelación con la microbiota intestinal es necesaria para poder establecer nuevos blancos terapéuticos dirigidos al hospedador.

Clostridioides difficile

Clostridioides difficile, antes conocida como *Clostridium difficile*, es una bacteria anaeróbica obligada Gram-positiva. Inicialmente fue identificada como parte de la flora de infantes sanos (1935), descrita como “activamente móvil, varilla de cuerpo pesado con esporas alargadas subterminales o casi terminales” ¹⁴³. En ese tiempo, la cepa se denominó *Bacillus difficilis* para reflejar la dificultad experimentada al momento de aislarla y cultivarla. No fue hasta los años setenta (1978) ¹⁶⁹ que una caracterización detallada de la bacteria reveló su implicancia en la enfermedad humana, al identificarse como agente causal de la colitis pseudomembranosa. Un rasgo característico de esta bacteria, que la distingue de otras especies de la clase Clostridia, es

su capacidad de descarboxilar ácido parahidroxifenilacético para producir p-cresol, lo que le da a *C. difficile* el olor característico tipo alquitrán u olor a cerdo o establo ¹⁴⁴.

La capacidad de *C. difficile* para causar colitis depende de una gama de factores de virulencia, incluyendo toxinas y factores de adherencia y motilidad. En respuesta a la disponibilidad limitada de nutrientes, *C. difficile* produce toxinas que atacan principalmente a las células epiteliales intestinales. Después de la endocitosis de la toxina, las células epiteliales experimentan necrosis, lo que conduce a la pérdida de integridad de la membrana intestinal, la exposición a microorganismos intestinales y la activación de la respuesta inflamatoria del hospedador ¹⁷⁰.

Todas las cepas de *C. difficile* toxigénicas presentan un locus de patogenicidad (PaLoc) formado por 5 genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE* y *tcdR*) (**Fig. 1**). Los principales factores de virulencia de *C. difficile* son dos toxinas, la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB), codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB* y de peso molecular de 308 y 270 kDa respectivamente ¹⁷¹. TcdA es una enterotoxina responsable de la acumulación de líquido en el íleon, mientras que TcdB es una citotoxina con una potencia citotóxica aproximadamente 100 a 1000 veces mayor que TcdA ¹⁷². El gen *tcdR* actúa como regulador positivo de la expresión de TcdA y TcdB, mientras que *tcdC* actúa como regulador negativo, evitando la expresión de todo el PaLoc. Finalmente, *tcdE* codifica una holina que se encargara de hacer poros en la membrana citoplasmática que permite la liberación de las toxinas ¹⁷³. Las cepas no toxígenas carecen del locus PaLoc.

Tanto TcdA como TcdB son citotoxinas con actividad glucosiltransferasa, causando la interrupción de las fibras de actina del citoesqueleto que resulta en una disminución de la resistencia transepitelial, la acumulación de líquido y la disrupción del epitelio intestinal. Esto conduce a la acumulación de líquido y daño intestinal severo ¹⁷⁴. Las toxinas también estimulan la liberación de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1 β , TNF- α , IL-8) a partir de células epiteliales y células inmunes residentes de las mucosas, lo que provoca un flujo de neutrófilos y conduce a una destrucción adicional del revestimiento intestinal como así también a liberación de TNF- α por parte de macrófagos activados, contribuyendo a la respuesta inflamatoria típica de la colitis ¹⁷⁵.

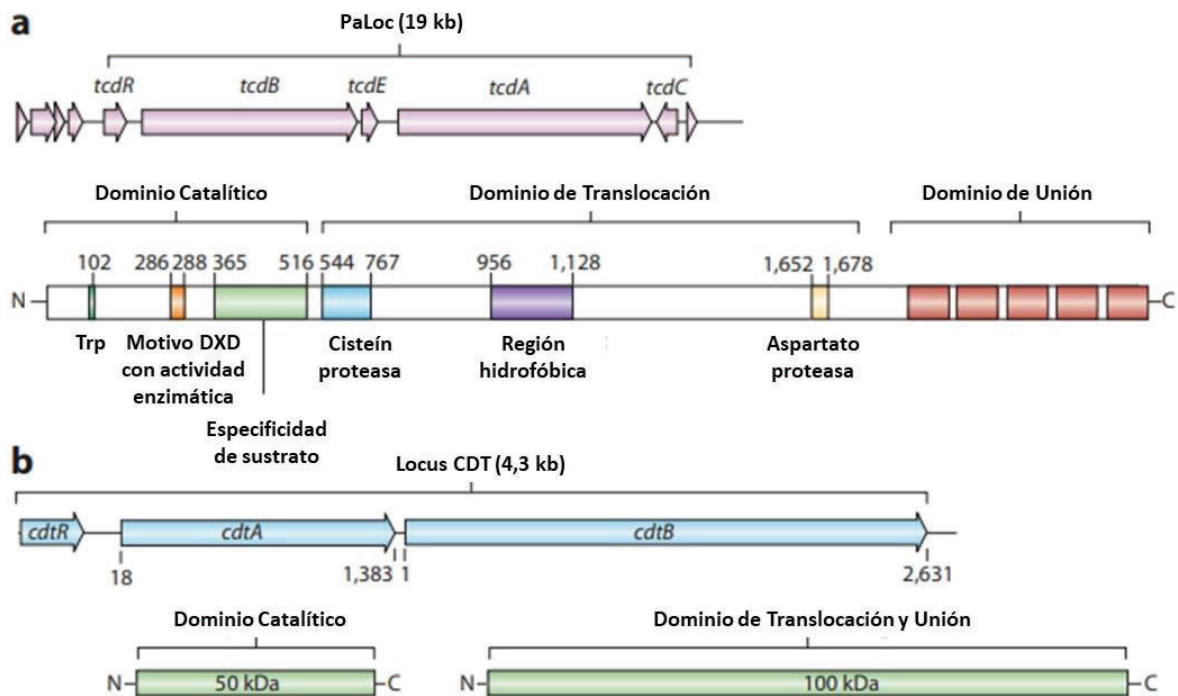


Fig. 1 Loci de patogenicidad. (A) Dos toxinas grandes, la toxina A y la toxina B (TcdA y TcdB), están codificadas en el locus de patogenicidad (PaLoc), que comprende cinco genes. Ambas toxinas son proteínas monocatenarias con varios dominios y motivos funcionales. TcdB se muestra en detalle debajo del PaLoc. (B) Una tercera toxina, la toxina binaria o CDT (*C. difficile* transferasa), está codificada en una región separada del cromosoma (CdtLoc) y comprende tres genes. La toxina binaria está compuesta por dos proteínas no ligadas, CdtB y CdtA. CdtB tiene una función de unión y CdtA es el componente enzimático. (Adaptado de *Nature Reviews Microbiology*, Rupnik M, et al. 7: 532).

Además del locus PaLoc, algunas cepas de *C. difficile* son portadoras de una transferasa (*C. difficile* transferasa: CDT) denominada también toxina binaria, formada por 2 subunidades: CDTa y CDTb, implicada en una mayor toxicidad y virulencia de estas cepas. Los genes que codifican esta toxina se encuentran en el locus Cdt (CdtLoc) (Fig. 1)¹⁷⁴. La CDT está presente típicamente en la cepa hipervirulenta BI/NAP1/027 (descrita por primera vez en Latinoamérica por Quesada-Gómez y col. en 2010 en Costa Rica¹⁷⁶) como así también en los ribotipos 078 y 023. El mecanismo patogénico de dicha toxina aún no está del todo dilucidado, pero existe una asociación entre su presencia y un aumento de la severidad de la enfermedad y una mayor mortalidad en los pacientes¹⁷⁷. Esta toxina mejora la adhesión de *C. difficile* a la célula diana ya que interfiere con la polimerización de la malla de actina que subyace a la membrana celular, lo que da lugar a protrusiones celulares que se forman por microtúbulos y una liberación aumentada de fibronectina a la superficie celular. Además, actúa a nivel del citoesqueleto de la célula provocando una mayor pérdida de líquidos¹⁷⁴.

C. difficile presenta también otros factores de patogenicidad, como algunas proteínas de superficie implicadas en su adhesión y estimulación del proceso inflamatorio, u otras implicadas en la unión a las células epiteliales intestinales y cuya expresión se ve afectada por determinados antibióticos como la ampicilina y la clindamicina. Las proteínas de superficie llamadas proteínas de la pared celular (Cwps), que incluyen las proteínas de la capa superficial (S) (SLPs), la adhesina Cwp66 y la cisteína proteasa Cwp84; están implicadas en la adherencia y colonización intestinal pero también son capaces de disparar fuertes respuestas inmunes ¹⁷⁸; lo que sugiere que estas proteínas podrían tener un papel muy importante en la patogénesis ¹⁷⁹.

La aparición mundial de cepas epidémicas de *C. difficile*, vinculadas a una mayor gravedad y mortalidad de la enfermedad, dio lugar a mayores esfuerzos de investigación para determinar los factores de virulencia y los mecanismos patogénicos utilizados por este microorganismo para causar la enfermedad. Sin embargo, las investigaciones se centran, en su mayoría, en el papel de los dos principales factores de virulencia, TcdA y TcdB ¹⁸⁰, mientras que el papel de las proteínas de *C. difficile* liberadas durante su crecimiento y expuestas en la bacteria permanecen poco exploradas. Los distintos factores de virulencia de *C. difficile* podrían dar lugar a diferentes mecanismos que lleven a la generación de una respuesta inmune protectora o a la inmunopatogénesis. Por lo tanto, evaluar el rol de estos factores resulta fundamental para comprender el desarrollo y desenlace de la CDI, así como también la implicancia en los casos de recurrencia.

Transmisión de la CDI

Los entornos sanitarios y la vía fecal-oral son las rutas más habituales de transmisión de *C. difficile*. Sin embargo, este patógeno también puede ser adquirido por contacto con portadores asintomáticos, ambientes contaminados y exposición a carnes, pescados y productos agrícolas ¹⁸¹. *C. difficile* se elimina en las heces. Por lo tanto, cualquier superficie, dispositivo o material (como inodoros, bañeras y termómetros rectales electrónicos) que se contamine con heces podría servir como depósito para las esporas de la bacteria que son altamente resistentes. Las esporas de *C. difficile* también se pueden transferir a través de las manos del personal sanitario, por lo que la CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de EEUU, por sus siglas en inglés) recomienda la utilización de guantes al ingresar a las habitaciones y durante la atención al paciente, así como una correcta higiene post-atención. Las esporas de *C. difficile* son resistentes al alcohol, incluso el uso de agua y jabón no es completamente suficiente para su eliminación,

haciendo más desafiante la inactivación de *C. difficile* comparándola con otros patógenos comunes. Las esporas de *C. difficile* pueden existir durante cinco meses en superficies duras^{182,183} y aunque muchos germicidas registrados por la EPA (Agencia de Protección Medioambiental de EEUU, por sus siglas en inglés) son capaces de eliminar la forma vegetativa de la bacteria, solo los desinfectantes a base de cloro de alta concentración y el peróxido de hidrógeno vaporizado pueden eliminar las esporas. Actualmente, no hay disponibles agentes esporicidas registrados por la EPA para utilizar como desinfectante de superficies^{184,185}. Más aún, actualmente se proponen nuevas rutas de contagio para la CDI. En reportes recientes se recuperaron aislamientos toxigénicos provenientes de secreciones nasales de perros, es decir que *C. difficile* se encuentra en el tracto respiratorio de estos animales y sus secreciones podrían considerarse como una nueva vía de transmisión¹⁸⁶.

Para que *C. difficile* se establezca en el hospedador y prolifere en la mucosa colónica, la flora normal del colon debe estar alterada (como ocurre con el uso de antimicrobianos) y *C. difficile* debe ser ingerida. Aunque estos eventos no necesariamente ocurren en ese orden¹⁸⁷, una vez que ambos suceden, el paciente puede verse colonizado por la bacteria o desarrollar CDI.

La infección por *C. difficile* es consecuencia de la ingestión de esporas de *C. difficile* toxigénica que resisten la acción del ácido gástrico, germinan en el intestino delgado y colonizan el colon, donde producen las toxinas que inician una serie de fenómenos mencionados anteriormente que culminan con la pérdida de la función de la barrera epitelial, la aparición de diarrea y la formación de pseudomembranas. Estas pseudomembranas se manifiestan como placas amarillo-blanquecinas de 1-2 mm de diámetro que, al evolucionar la enfermedad, se unen hasta confluir en toda la pared del colon. En los estudios microscópicos, las pseudomembranas contienen leucocitos necróticos, fibrina, moco y restos celulares, y la mucosa subyacente está infiltrada por neutrófilos¹⁸⁸.

Cuando *C. difficile* es transmitida a través de la vía fecal-oral, el período desde la ingestión de esporas hasta el comienzo de los síntomas es variable, pero típicamente corto. El momento y el desarrollo de la enfermedad clínica dependen tanto de factores microbiológicos como bioquímicos e inmunológicos presentes en el intestino del paciente. La sintomatología clínica después de la adquisición de esporas es variable y va desde la colonización transitoria del intestino hasta la enfermedad fulminante. Las personas con una respuesta inmune adecuada eliminarán la infección y/o se convertirán en portadores asintomáticos de *C. difficile*. Estas personas proporcionan un reservorio potencial para su posterior transmisión, especialmente dentro de una población hospitalaria. Aunque los portadores aumentan la contaminación

ambiental e incrementan el riesgo de transmisión a otros, la colonización asintomática no aumenta el riesgo de CDI; por el contrario, ha sido sugerido que los portadores asintomáticos podrían estar protegidos contra la enfermedad sintomática generando una respuesta inmune exitosa frente a la infección ¹⁸⁹.

La patogénesis de *C. difficile* puede dividirse en tres etapas una vez generada la disrupción de la microbiota intestinal: 1) contaminación por esporas y su germinación en el tracto digestivo; 2) multiplicación de células vegetativas y colonización intestinal; 3) producción de las toxinas TcdA y TcdB, y para algunas cepas una toxina adicional, la toxina binaria, que son responsables de los signos clínicos (**Fig. 2**). *C. difficile* produce las esporas que facilita su propagación. Por otro lado, el lumen del colon humano es anóxico, permitiendo que bacterias anaerobias obligatorias como *C. difficile* sobrevivan y, si las condiciones son adecuadas, proliferen, produzcan toxinas y dañen el epitelio intestinal.

Una vez ingeridas, las esporas son capaces de atravesar el ácido gástrico presente en el estómago. Al llegar al intestino delgado, las esporas germinan tomando ventaja de los ácidos biliares primarios (principalmente taurocolato) y diferentes aminoácidos presentes en el intestino; dado lugar a bacterias vegetativas de replicación activa. Las células vegetativas de *C. difficile* luego pasan a través de la capa de moco y se adhieren a las células epiteliales intestinales ¹⁹⁰ liberando las toxinas que son las responsables del daño. Las exotoxinas TcdA y TcdB alteran las células epiteliales del colon y estimulan la liberación de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias y la migración de células inmunes. Este proceso conduce a una intensa respuesta inflamatoria que provoca la inflamación aguda del intestino grueso (**Fig. 2**).

Como fue mencionado anteriormente, el espectro de la enfermedad clínica va desde diarrea leve hasta megacolon tóxico, perforación colónica y muerte. Tanto las características de la cepa bacteriana implicada como el metabolismo y la respuesta inmune del hospedador influyen en la severidad de la CDI, el riesgo de recurrencia y la mortalidad ¹⁹¹.

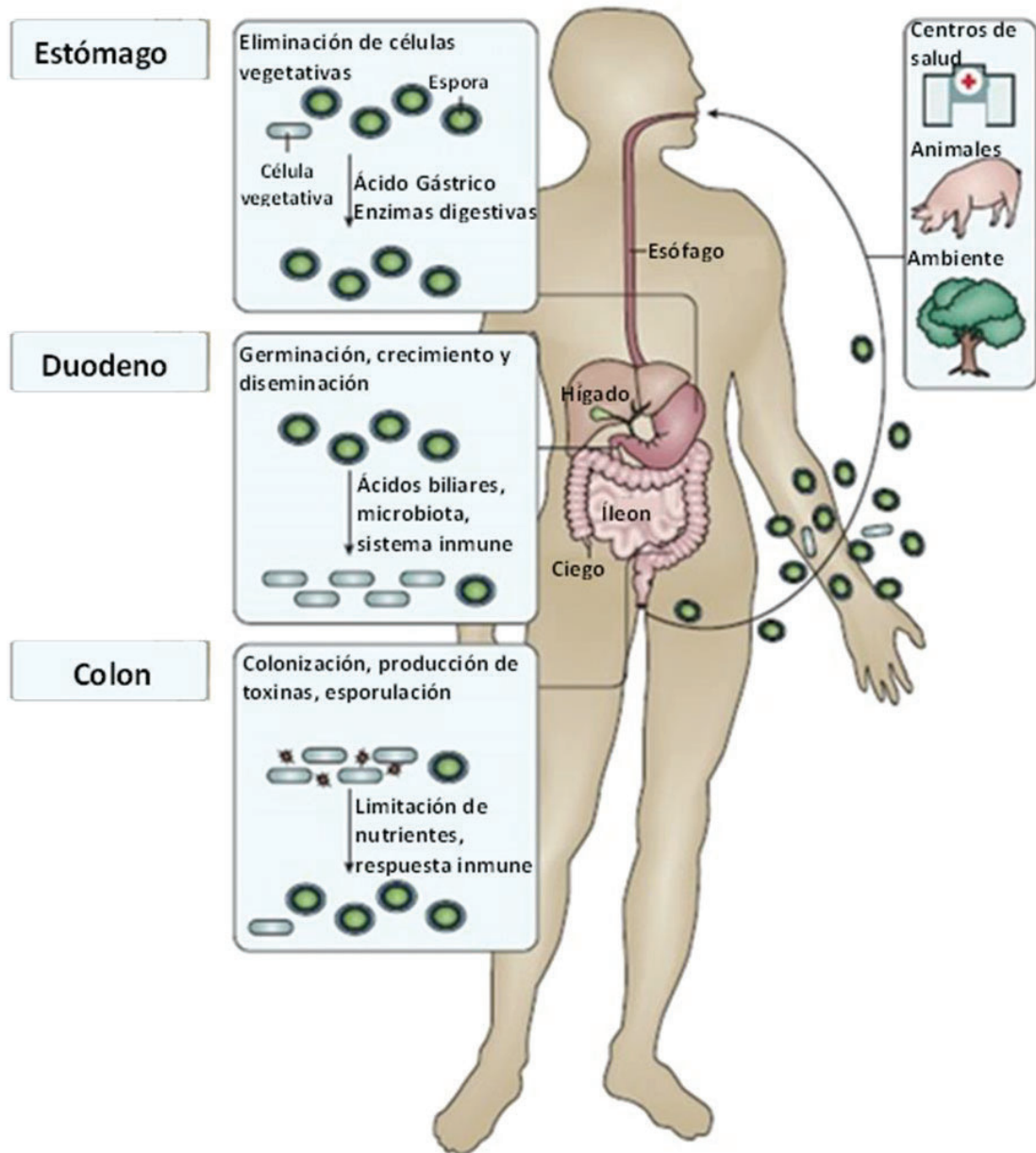


Fig. 2. Etapas del ciclo de vida de *C. difficile* en el tracto gastrointestinal. *C. difficile* es propagada a través de la vía fecal-oral. La bacteria es ingerida ya sea en su forma vegetativa o como esporas resistentes, que pueden sobrevivir por largos periodos en el medioambiente y pueden atravesar el ácido estomacal. En el intestino delgado las esporas germinan hacia la forma vegetativa. En el intestino grueso, la CDI puede surgir si la flora normal ha sido interrumpida por terapias con antibióticos. *C. difficile* se reproduce en las criptas intestinales, liberando las toxinas A y B que causan inflamación severa. Restos mucosos y celulares son expulsados, lo que lleva a la formación de pseudomembranas. La toxina A atrae a neutrófilos y monocitos y la toxina B degrada las células epiteliales del colon, conduciendo a la colitis, formación de pseudomembrana y diarrea acuosa. (Adaptado de *Nature reviews Disease*, Smits, W.K., et al. 2016, 2:16020).

Microbiota

La microbiota o microflora constituye las comunidades microbianas que viven en las diferentes partes del cuerpo humano, superando en número a las células hospedador por un factor de 10.

Particularmente, al nacer (o incluso desde el útero), el intestino es colonizado por microorganismos comensales que han evolucionado conjuntamente con el hospedador durante miles de años para formar una relación compleja y mutuamente beneficiosa¹⁹². Esta coexistencia temprana es esencial en la formación de la respuesta del sistema inmune para evitar respuestas inmunes indeseadas a los componentes microbianos intestinales^{193,194}. La microbiota intestinal interactúa estrechamente con los componentes del sistema inmune y, en consecuencia, la composición y las actividades metabólicas de estas redes bacterianas intestinales dan forma y participan en el desarrollo y buen funcionamiento de la inmunidad innata y la adaptativa. Típicamente, estas interacciones entre la microbiota y el sistema inmunitario son homeostáticas y están estrictamente reguladas. Por lo tanto, cualquier perturbación en este fino equilibrio podría influir sobre las respuestas inmunes montadas por el hospedador.

Es así que la microbiota puede promover la resistencia a la colonización por especies patógenas; Pero también, la composición de algunas microbiotas puede conducir a una expansión o a una mayor virulencia patogénica. Un ejemplo claro resulta al observar que las diferencias en la composición de microbiotas de los ratones determinan la susceptibilidad a la infección por *Citrobacter rodentium*. El trasplante de microbiotas de cepas de ratones susceptibles a la infección induce una susceptibilidad similar en animales que no son susceptibles y el trasplante de microbiotas de animales resistentes conducen a una resistencia a la infección en animales previamente susceptibles¹⁹⁵. Otro ejemplo lo constituye la microbiota intestinal de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en inglés) que presentan una composición diferente a la de los individuos sanos¹⁹⁶. Estos cambios se observan en los microbios anaeróbicos "beneficiosos", como los Bacteroidetes y un subgrupo de los Firmicutes. Por lo tanto, es evidente que se necesitan ciertos microbios intestinales para la regulación de las respuestas inmunitarias y que las perturbaciones en la composición microbiota podrían dar lugar a una falta o fallas en la inmunorregulación, a la proliferación de microorganismos más patogénicos y a la promoción de la inflamación, particularmente en individuos genéticamente susceptibles¹⁹⁷.

La causa más común de susceptibilidad a la CDI son los antibióticos ¹⁹⁸. Casi todos los antibióticos de amplio espectro han sido implicados en la alteración del microbioma intestinal, condición que se conoce como disbiosis (**Fig. 3**). La disbiosis se caracteriza por una reducida diversidad de microorganismos, una reducida abundancia de bacterias anaerobias obligatorias y una expansión de bacterias anaerobias facultativas del phylum Proteobacteria, en su mayoría miembros de la familia Enterobacteriaceae. La disbiosis es el principal factor de riesgo para la infección por *C. difficile* ya que proporciona un ambiente ideal para la expansión de la bacteria ^{193,199}. Varios componentes de una microbiota saludable contribuyen a prevenir la susceptibilidad del hospedador a la infección y la diseminación de las bacterias patógenas, destacando la importancia de las bacterias comensales para combatir a *C. difficile* y a otros patógenos ^{171,198}. Las bacterias comensales contribuyen a inhibir la germinación, colonización y diseminación de *C. difficile* desconjugando ácidos biliares primarios a ácidos biliares secundarios ^{200,201} y también pueden inhibir el crecimiento *C. difficile* mediante la liberación de bacteriotoxinas con actividad antimicrobiana contra microorganismos Gram-positivos ^{202,203}.

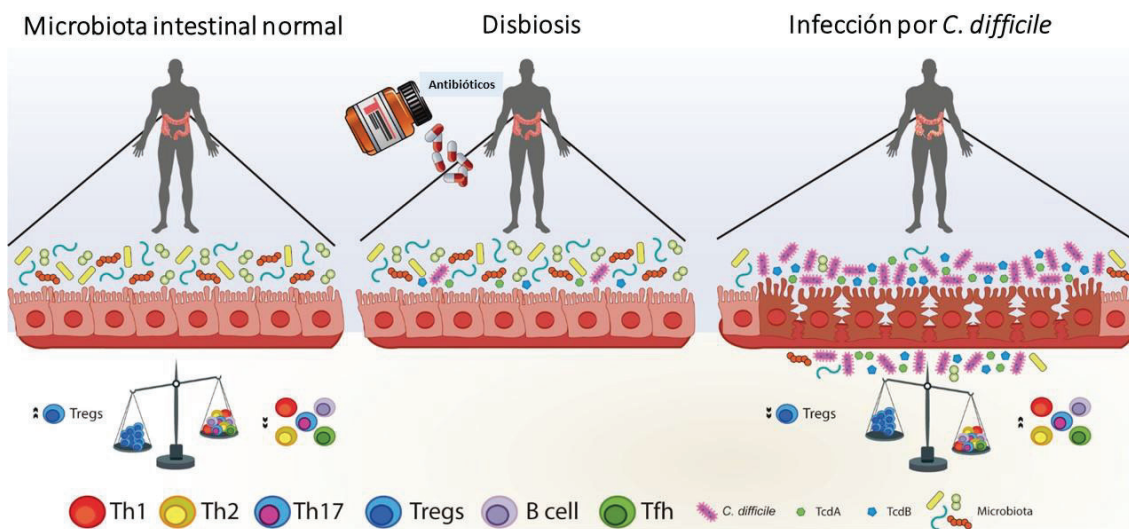


Fig. 3. Impacto de los antibióticos en la microbiota y la expansión de *C. difficile*. Una microbiota diversa confiere resistencia a la colonización por patógenos entéricos en el epitelio intestinal. El tratamiento con antibióticos disminuye la diversidad de la microbiota y lleva a una expansión de la población de *C. difficile*. Las toxinas liberadas por la bacteria (TcdA y TcdB) producen daño de las células epiteliales, lo cual provoca inflamación y muerte celular, además del desbalance de las poblaciones inmunitarias en la mucosa intestinal (Adaptado de *J Leukoc Biol.* Hernández Del Pino RE, Barbero AM, Español LÁ, Morro LS, Pasquinelli V. *The adaptive immune response to Clostridioides difficile: A tricky balance between immunoprotection and immunopathogenesis.* 2020;1-16.)

La patogénesis temprana de la CDI (0-12 horas) se caracteriza predominantemente por una inflamación intestinal aguda mediada por la respuesta inmune innata (**Fig. 4**)²⁰⁴.

El primer paso para el hospedador en cuanto a la defensa contra la CDI es prevenir o retrasar la unión de la bacteria o de las toxinas secretadas a las células epiteliales intestinales donde pueden causar daño. Una capa de moco que cubre el epitelio crea una barrera de defensa dinámica contra las bacterias lumbinales; sin embargo, muchos patógenos incluyendo *C. difficile*, han desarrollado mecanismos para reducir la producción de mucina durante la infección. Otro mecanismo de defensa en la superficie epitelial es la presencia de péptidos antimicrobianos, defensinas y catelicidinas secretadas por las células de Paneth de la cripta intestinal y también por leucocitos. Se ha demostrado que la catelicidina y las defensinas reducen significativamente el daño tisular y la inflamación causados por TcdA y TcdB de *C. difficile* y reducen la producción de citoquinas inflamatorias²⁰⁴.

Las toxinas inducen la liberación de mediadores inflamatorios por parte de células intestinales epiteliales, neuronales e inmunes a través de la activación de diferentes PRRs incluyendo la señalización a través de TLR4, TLR5 y NOD1 y la activación del inflamasoma. Los actores claves de la inmunidad innata son las células epiteliales intestinales (IECs) y las células inmunitarias intestinales tales como macrófagos, monocitos, mastocitos, células linfoides innatas (ILCs) y CDs¹⁷⁹. Después de inducirse la ruptura de la barrera epitelial intestinal, las células inmunitarias dentro de la mucosa son activadas por TcdA y TcdB, conduciendo finalmente a la liberación de mediadores inflamatorios, que incluyen IL-12, IL-18, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , MIP-1a, MIP-2, IL-8 y leptina. Esto, además, conlleva a una afluencia de neutrófilos establecida por quimioattractantes liberados por las células epiteliales e inmunológicas. Estos factores pueden exacerbar la inflamación y ser responsables del daño de las células del hospedador y de muchas de las características histopatológicas de las enfermedades asociadas a *C. difficile*¹⁷⁹.

Diversos reportes han revelado una naturaleza controversial para el rol de los neutrófilos en la CDI, ya que tienen la capacidad de reducir la carga de patógenos, pero también pueden mediar el daño tisular. Se ha observado que fallas en el reclutamiento de neutrófilos se correlacionan con una mayor morbilidad y mortalidad en modelos murinos²⁰⁵⁻²⁰⁷. Además, en pacientes con leucemias hospitalizados y en pacientes con trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas, la neutropenia es un marcador de susceptibilidad a CDI y de CDI recurrente, respectivamente^{208,209}. Por el contrario, la inhibición del reclutamiento de neutrófilos mediante la administración de anti-CD18 en conejos²¹⁰ o anti-MIP2²¹¹ en ratas conduce a la reducción de

la enterotoxicidad inducida por TcdA. Incluso, se ha propuesto que la depleción de granulocitos no posee ningún impacto sobre la susceptibilidad a la CDI en ratones ²¹².

Los mastocitos intestinales también juegan un papel importante en las respuestas inflamatorias mediadas por las toxinas. Ambas toxinas A y B conducen a la activación, degranulación y la liberación de mediadores inflamatorios de los mastocitos. Por ejemplo, TcdA induce la producción de IL-8 por los mastocitos, un quimioattractante de neutrófilos, en las líneas celulares de colon humano ¹⁷⁹.

El papel de otras células inmunitarias, incluyendo macrófagos, monocitos y CDs, se ha extrapolado generalmente a partir de estudios *in vitro* y *ex vivo* usando líneas celulares humanas y de ratón, monocitos humanos y CDs derivadas de monocitos. Estos estudios han demostrado que las toxinas de *C. difficile* pueden estimular la liberación de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias dependiente de MAPK y p38, y particularmente la toxina A induce la producción de IL-8 mediada por NFκB en monocitos humanos ²¹³.

A su vez, es importante mencionar que las CDs en la mucosa intestinal desempeñan varias funciones, como la fagocitosis, el procesamiento y la presentación de antígenos generando la comunicación con la respuesta inmune adaptativa ¹⁷⁹. Los fagocitos mononucleares son una de las poblaciones más abundantes de leucocitos en la mucosa intestinal sana, y los macrófagos constituyen la mayor población de fagocitos. Los macrófagos intestinales contribuyen a la respuesta inmune a través de, no sólo la secreción de citoquinas y quemoquinas, sino también mediante de su potencial fagocítico y microbicida y su capacidad de actuar como células presentadoras de antígenos ²¹⁴.

Recientemente, Abt y col. demostraron que las ILCs de tipo 1 y tipo 3 coordinan las respuestas tempranas del hospedador para proporcionar resistencia inicial contra la CDI ²¹⁵. Las ILCs son células presentes en las mucosas que comparten características con células inductoras de tejidos linfoides (LTi) y células asesinas naturales (NK) y que reflejan el fenotipo y funciones de las células T ²¹⁶. La función primaria de las ILCs en la mucosa es la secreción de citoquinas importantes para la defensa del hospedador y la reparación de tejidos ¹⁷⁹. Dos subgrupos de las ILCs, ILC1 que expresan T-bet y producen IFN-γ, e ILC3 que expresan Rorγt y producen IL-22, se activan durante la infección aguda por *C. difficile* y contribuyen a la defensa del hospedador. La IL-22 induce la producción de péptidos antimicrobianos en el intestino inmediatamente después de la infección. El IFN-γ producido por las ILC1 puede aumentar los mecanismos fagocíticos y la expresión de las enzimas productoras de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno en la mucosa

colónica ²¹⁷. También se ha demostrado un rol protector de las ILCs de tipo 2, que expresan GATA3, mediante mecanismos aún desconocidos pero que responden a la presencia de IL-33 durante la CDI ²¹⁸.

La inmunidad innata es esencial para la contención inicial de las infecciones, contribuye a la resolución de enfermedades y orquesta el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Por lo tanto, una mejor comprensión de los mecanismos innatos involucrados en la respuesta frente a *C. difficile* podría contribuir a comprender el desarrollo y la patogénesis de la CDI.

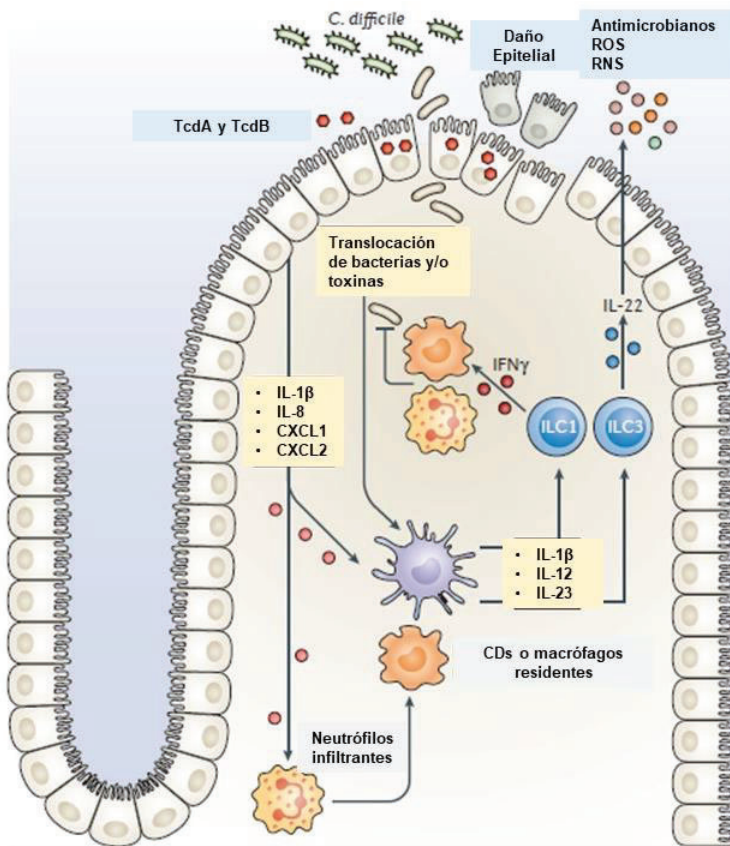


Fig. 4 Respuesta inmune innata frente a *C. difficile*. Al perderse la integridad epitelial y al traslocarse bacterias, las células epiteliales intestinales y las células inmunes innatas residentes secretan quemoquinas pro-inflamatorias (CXCL1, CXCL2 e IL-8) y citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL -12 e IL-23), que conducen al reclutamiento de neutrófilos y a la activación de células linfoides innatas (ILCs). La señalización de IL-12 impulsa la expresión de IFN- γ , mientras que IL-1 β e IL-23 inducen la producción de IL-22. Las citoquinas efectoras IFN- γ e IL-22 inducen mecanismos de defensa tales como el aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos y neutrófilos, y la producción de péptidos y enzimas antimicrobianas que sintetizan especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS). Estos mecanismos de defensa limitan la diseminación bacteriana, atenúan la actividad de las toxinas y contribuyen a reparar el daño epitelial. (Adaptado de *Microbiology*, Abt, M.C., McKenney, P.T. & Pamer, E.G. *Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence*. *Nature reviews*. 14, 609-620 (2016)).

Macrófagos y monocitos

Como fue mencionado en el capítulo uno, los macrófagos cuentan con un vasto repertorio de mecanismos microbicidas. Pueden expresar receptores y diversas moléculas en su superficie, secretar citoquinas y quemoquinas, intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno y fagocitar tanto células propias como patogénicas que serán degradadas en los fagolisosomas. Sin embargo, es importante destacar que, bajo condiciones homeostáticas dentro de los tejidos, los macrófagos mantienen un estado no inflamatorio para evitar daños tisulares. En la mucosa intestinal, los macrófagos son unos de los leucocitos más abundantes y se encuentran en mayor

número en la lámina propia, que forma el núcleo de la mucosa subyacente al epitelio superficial. A diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, los macrófagos intestinales requieren renovación constante a partir de monocitos circulantes ²¹⁹. Por lo tanto, la composición del compartimento de macrófagos en la mucosa intestinal cambia notablemente cuando hay alteración de la homeostasis del tejido por infección, inflamación o trauma ²²⁰.

En cuanto al reclutamiento de los monocitos hacia la lámina propia intestinal durante la CDI, se ha descrito la importancia de la señalización vía MyD88, la expresión de CCR2 ^{221,222} e IL-23 ²²² en el colon. Además, varios reportes destacan la capacidad de los monocitos para promover un perfil de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 así como también de quemoquinas, siendo de especial importancia la producción de IL-8 que induce la migración de neutrófilos, los cuales pueden contribuir al daño en el intestino ^{223–225}. También ha sido reportado que las toxinas de *C. difficile* poseen un efecto citotóxico sobre monocitos y macrófagos ^{226,227}, eliminándolos rápidamente. Esta pérdida podría impedir el correcto funcionamiento del sistema inmune frente a *C. difficile in vivo*.

Si bien se han descrito algunas funciones de los macrófagos durante la infección por *C. difficile*, los antecedentes indican que aún resta mucho por dilucidar. De hecho, el rol de los diferentes perfiles macrofágicos o los macrófagos residentes de tejido en la CDI es pobremente comprendido en la actualidad.

Durante CDI, los macrófagos producen citoquinas y quemoquinas proinflamatorias, así como también muestran expresión de ciertos receptores y moléculas que indican activación de los macrófagos. La estimulación de la línea celular macrofágica murina J774A.1 con proteínas de la capa superficial (SLPs) aumentó la expresión de TLR2, TLR4 (con su correceptor CD14), CD40, CD80 y CMH II ²²⁸. La activación de TLR4 con SLPs también desencadena la señalización vía p38 y aumenta la producción de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-12p40, así como la regulación positiva de las quemoquinas MIP-1 α , MIP-2 y MCP ²²⁸. Vohra y col. también evidenciaron una respuesta proinflamatoria caracterizada por la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12p70 en la línea celular macrofágica humana THP-1 estimulada con diferentes factores de virulencia de *C. difficile* (flagelos, SLPs, HSP42 y HSP60) ¹⁷⁸.

Por otro lado, ha sido propuesto que la activación del Inflamasoma puede ser beneficiosa para controlar la carga bacteriana, ya que su inhibición resultó en una progresión severa de la enfermedad durante la CDI ^{229,230}. Macrófagos peritoneales murinos infectados con *C. difficile* toxigénica producen *in vitro* pro-IL-1 β en una forma dependiente de MyD88 y parcialmente

dependiente de TLR2 ²³⁰. Además, *C. difficile* toxigénica induce la activación del inflamasoma a través de la vía ATP-P2X7 y posteriormente induce la piroptosis (muerte celular lítica programada altamente inflamatoria) dependiente de caspasa-1 ²³⁰.

Aunque la presencia intracelular de la bacteria aún no se ha demostrado, se ha propuesto que la fagocitosis de *C. difficile*, de sus toxinas u otros componentes es fundamental para disparar estos mecanismos, ya que la activación del inflamasoma requiere del reconocimiento intracelular del patógeno ²³⁰. Paredes-Sabja y col. demostraron que, a pesar de ser eficientemente reconocidas e internalizadas por la línea celular macrofágica murina Raw 264.7, las esporas de *C. difficile* logran sobrevivir dentro de los macrófagos evitando su eliminación y promoviendo la persistencia en el intestino ²³¹. Algunos trabajos también demuestran interacción e internalización de las toxinas de *C. difficile* por parte de monocitos y células epiteliales ^{226,232,233}. Sin embargo, tanto los procesos endocíticos en los macrófagos primarios como las moléculas del hospedador que intervienen en estos procesos no han sido demostrados. Tampoco se ha evaluado la internalización de bacterias completas.

Es posible que diferentes componentes bacterianos desencadenen diferentes respuestas en los macrófagos. Es evidente que tanto las toxinas como otros componentes son capaces de activar a los macrófagos induciendo una respuesta proinflamatoria, pero estas células también pueden constituir un reservorio de esporas de *C. difficile*. Entonces, resulta indispensable conocer en profundidad las funciones macrofágicas que intervienen durante la CDI para comprender su implicancia tanto durante las respuestas protectoras como en las respuestas que median la inmunopatogénesis de la enfermedad.

Además de las respuestas innatas, la activación de la inmunidad adaptativa conduce a la producción de respuestas protectoras, pero también puede desencadenar inflamación no controlada o patológica. Si bien no es el foco de este trabajo, a continuación, se describe de manera resumida la respuesta inmune adaptativa frente a *C. difficile* (**ver cuadro 1**). Las **Figuras 5 y 6** sintetizan el rol de las células Tfh y la respuesta B y de las células Th (con foco en las Th17) durante la CDI.

Cuadro 1. Respuesta inmune adaptativa en la infección por *C. difficile*. Aunque las células T y las células B no contribuyen a la resolución de la fase aguda de la infección por *C. difficile* en ratones, los datos clínicos indican que las respuestas inmunitarias adaptativas pueden tener efectos protectores. Los anticuerpos contra las toxinas de *C. difficile* están naturalmente presentes en hasta el 60% de adultos sanos y niños mayores¹⁷⁹. La importancia de los anticuerpos para proteger al hospedador de la CDI está respaldada por niveles bajos de anticuerpos séricos dirigidos contra las toxinas A y B observadas en pacientes con CDI recurrente en comparación con pacientes que no sufren recurrencias¹⁷¹. Es claro que las células Tfh y las células B tienen un rol protector a través de la neutralización de las toxinas y en la prevención de la recurrencia. Pero los pacientes con recurrencia fallan en la generación de una respuesta B de memoria apropiada lo cual podría también estar relacionado con la respuesta Tfh y la regulación previa de estas células por la respuesta inmune innata.

Por otra parte, las células T residentes representan un componente principal de la mucosa intestinal. La desregulación de subpoblaciones de células T está relacionada con la patogénesis del intestino en las enfermedades inflamatorias y en el cáncer; y parecen ser las principales responsables de la iniciación y desarrollo de la inflamación en la lámina propia del intestino. Estas respuestas celulares adaptativas desreguladas implican la activación de linfocitos Th1, Th2, Th17 y la supresión de la actividad de las células Treg^{263–265}. Buonomo y col., han propuesto que mantener una respuesta inflamatoria equilibrada para combatir la infección mientras se limita el daño tisular sería beneficioso durante la CDI²⁶⁶.

Las células T regulan tanto la naturaleza como la forma de las respuestas innatas. El balance entre las respuestas Th1, Th2 y Th17 tiene un impacto en la regulación de las poblaciones migratorias y residentes de las mucosas tales como las ILCs, eosinófilos, neutrófilos y macrófagos; los cuales llevan a patología o a protección frente a la enfermedad¹⁵⁵. Han sido demostrados tanto roles patológicos como protectivos para las respuestas Th1 y Th17 en la CDI¹⁵⁵.

Kim y col. demostraron que la expresión de IFN- γ media la mayor severidad de la enfermedad en aquellos ratones deficientes para IL-10 y que el IFN- γ podría ser un importante blanco molecular para el control de la CDI²⁶⁷. Asimismo, se han observado mayores niveles de IFN- γ en pacientes con recurrencias como también de IL-17, indicando una respuesta hacia los linajes Th1 y Th17²⁶⁸. Por el contrario, algunos estudios muestran una respuesta Th1 y Th17 prevalente en respuesta a diferentes cepas de *C. difficile* que ha sido asociada con un rol inmunoprotectivo^{155,269–272}.

Sin embargo, la mayoría de los trabajos han sido realizados en ratón, y las poblaciones Th en humanos permanecen pobremente exploradas en la CDI.

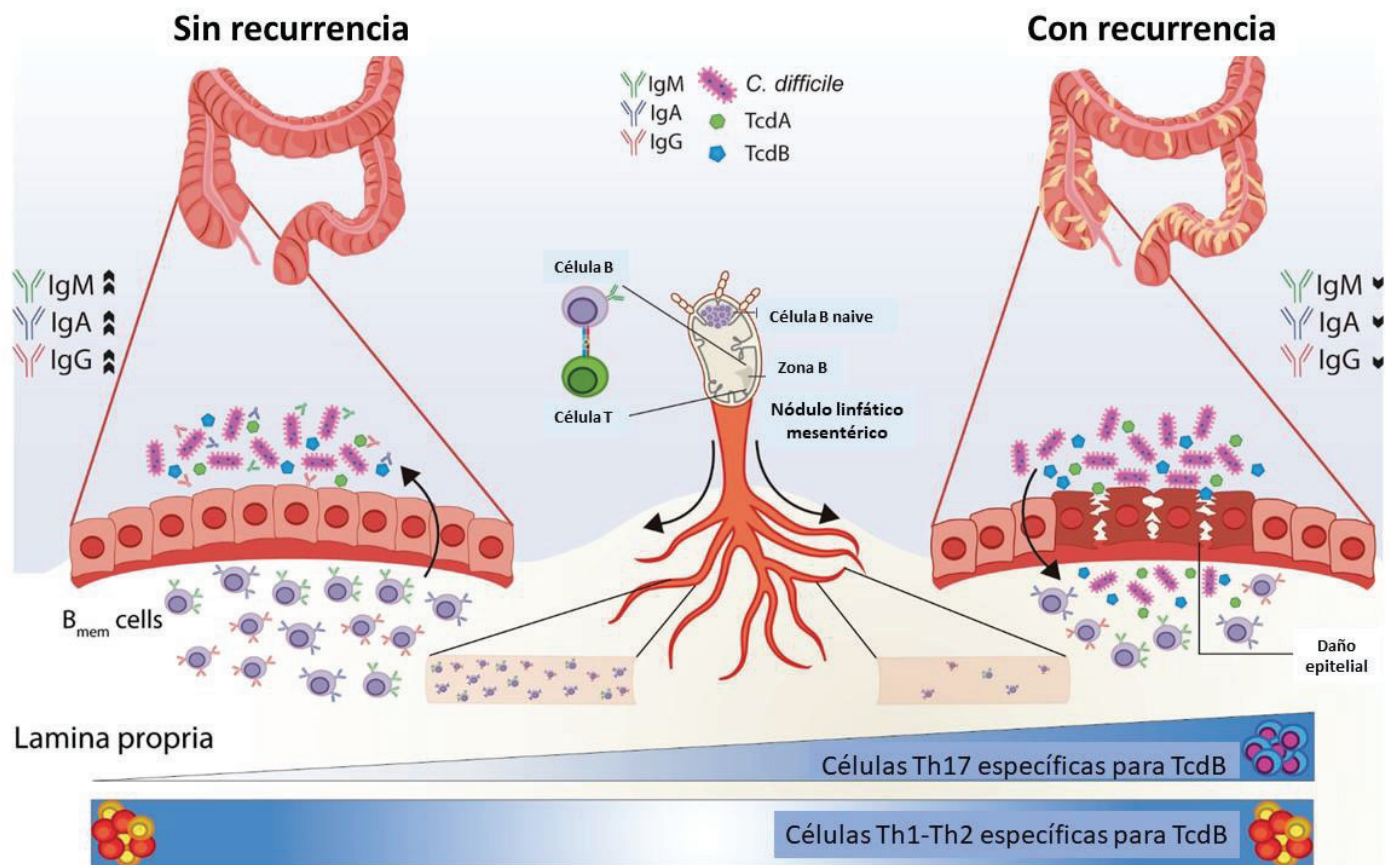


Fig. 5. Respuesta Tfh-B en la CDI. La respuesta humoral delinea el resultado de la infección por *C. difficile* (CDI). La colaboración de las células Tfh-B en los ganglios linfáticos mesentéricos, la migración al sitio de infección y la producción de anticuerpos específicos son necesarias para contener la CDI. Los pacientes que desarrollan una respuesta inmune apropiada contra *C. difficile* (sin recurrencia) son capaces de inducir células B de memoria. En los ganglios mesentéricos o tejidos linfoides secundarios, las células Tfh interactúan con las células B y favorecen el desarrollo de células plasmáticas que reconocen específicamente las toxinas y antígenos de *C. difficile* no toxigénicos (tales como SLP). Posteriormente, estas células plasmáticas alcanzan la lámina propia del colon donde pueden producir y liberar grandes cantidades de anticuerpos específicos que conducen a la resolución de la enfermedad. La edad avanzada, terapias con antibióticos, supresión de ácido gástrico e infección con una cepa hipervirulenta de *C. difficile* se consideran actualmente como los principales factores de riesgo de CDI recurrente. Sin embargo, factores adicionales de riesgo como insuficiencia renal, estadías prolongadas en el hospital y una respuesta inmune adaptativa deficiente a las toxinas A y B han sido reportados. Los pacientes con episodios de recurrencia tienen una respuesta deficiente de las células B de memoria. La reducción de estas células junto con la falla en la producción de IgA, IgG e IgM permiten que *C. difficile* se replique e induzca daño epitelial. Además, los pacientes con CDI recurrentes tienen una frecuencia reducida de células CD4+ Th17 específicas de TcdB circulantes, pero no células CD4+ Th1 y Th2. Se ha demostrado que estas deficiencias en la respuesta inmune adaptativa de los pacientes con recurrencias podrían resolverse utilizando el trasplante de microbiota fecal como terapia. (Adaptado de J Leukoc Biol. Hernández Del Pino RE, Barbero AM, Español LÁ, Morro LS, Pasquinelli V. The adaptive immune response to Clostridioides difficile: A tricky balance between immunoprotection and immunopathogenesis. 2020;1-16.)

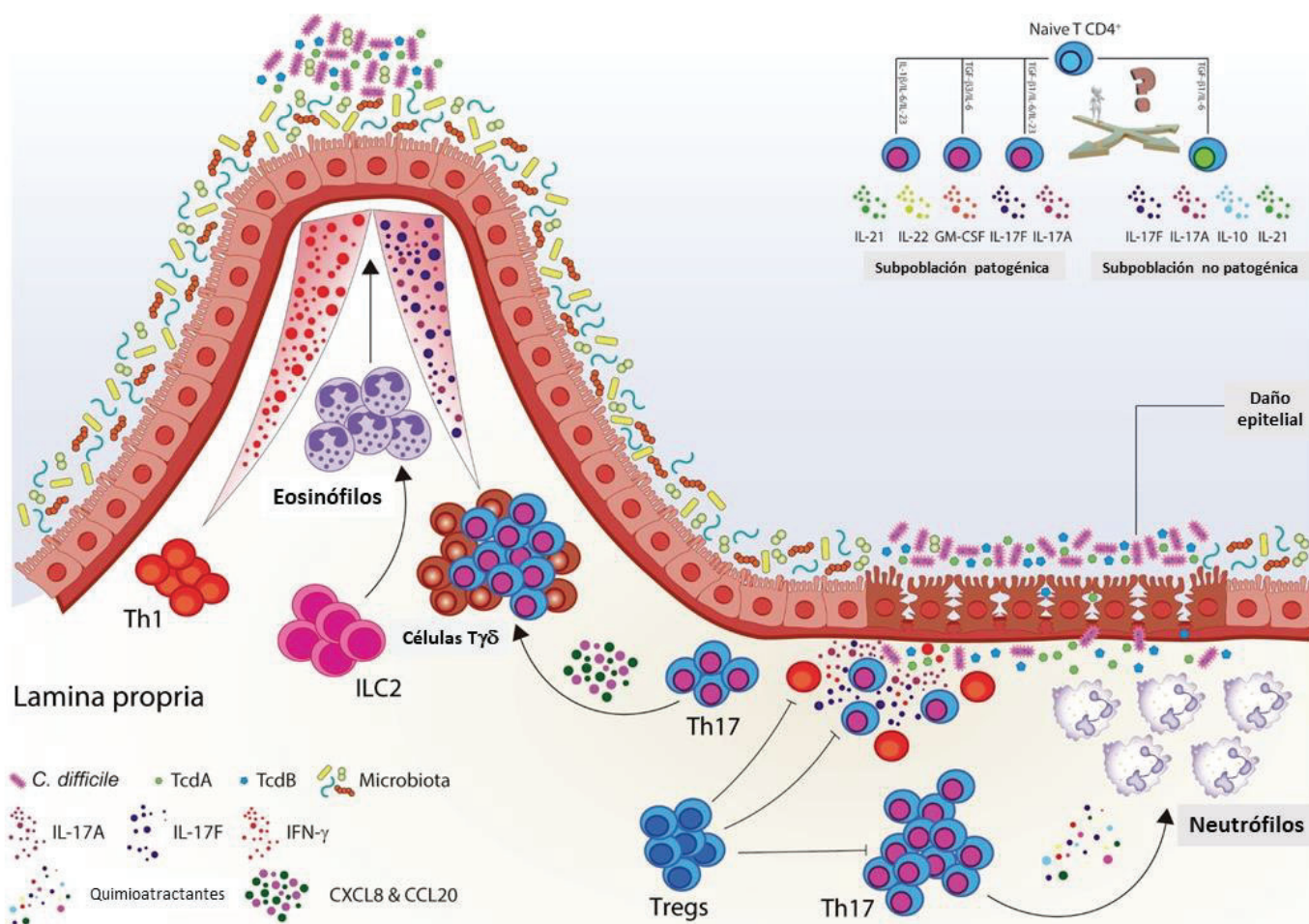


Fig. 6. Rol de las células Th17 en la inmunoprotección y la inmunopatogénesis durante la CDI. La colonización intestinal y la liberación de toxinas por *C. difficile* induce una respuesta aguda del hospedador caracterizada por daño, pérdida de la integridad de la capa de moco y translocación de patobiontes. En esta etapa, la respuesta inmune adaptativa mediada por Th17 y Tc17 (no mostrada) secreta IL-17A/F que induce la producción de otras citoquinas y quemoquinas (G-CSF, CXCL1, CXCL2, CXCL5 y CXCL8) que modulan la migración de neutrófilos. La acumulación de neutrófilos en el sitio de la infección induce inflamación que conduce a inmunopatogénesis y mal pronóstico. En colaboración con el papel patogénico de las células Th17, la población Th1 produce citoquinas proinflamatorias, como IFN- γ , que aumentan el daño de la barrera epitelial colónica. Las células T regulatorias contrarrestan la inflamación intestinal inducida por las poblaciones Th17 y Th1. Por otro lado, la activación de ILC2 aumenta el número de eosinófilos que liberan IL-4, inclinando la balanza hacia un perfil tipo 2 que media la protección. El mutualismo de la microbiota comensal (por ejemplo, *C. albicans*) con la respuesta inmune del hospedador conduce a la protección contra la CDI a través de la inducción de la producción de IL-17A por células Th17 y T $\gamma\delta$. Las células Th17 son capaces de producir tanto CXCL8 como CCL20 que inducen el reclutamiento de más células Th17 que, junto con la población Th1, podría mediar en la generación de mecanismos de defensa que limitarían la diseminación bacteriana. (Adaptado de *J Leukoc Biol.* Hernández Del Pino RE, Barbero AM, Español LÁ, Morro LS, Pasquinelli V. *The adaptive immune response to Clostridioides difficile: A tricky balance between immunoprotection and immunopathogenesis.* 2020;1-16.)

Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAMF1)

Como se ha mencionado en el capítulo uno, SLAMF1 (SLAM o CD150) puede regular la producción de diversas citoquinas y quemoquinas en CDs ⁶⁴⁻⁶⁶ y está involucrado en funciones fagolisosomales de macrófagos murinos ⁶⁷. SLAMF1 es capaz de reconocer e interactuar con el virus de sarampión ⁷⁰ y morbilivirus ⁷¹ así como también con *T. cruzi* ⁶⁹ y bacterias como *E. coli* ^{67,72}, *C. Rodentium* ⁷², *B. abortus* ⁷³ y *S. typhimurium* ⁶⁷. Es así que SLAMF1 participa en las funciones de diversas células inmunes en distintos contextos patológicos.

Específicamente en el escenario de la inmunidad de mucosas, ha sido demostrado que en ratones deficientes para SLAMF1 la producción de TNF- α e IL-12 por parte de macrófagos peritoneales disminuye cuando los mismos son estimulados con LPS y/o IFN- γ ⁶⁶. También se detectó un alto número de monocitos, macrófagos y otras células SLAMF1⁺ a través del intestino inflamado de pacientes con la enfermedad de Crohn ⁸⁰. Van Driel y col. han propuesto que SLAMF1 podría regular la homeostasis de los macrófagos durante la enterocolitis crónica o aguda ¹³⁹. En congruencia con una enfermedad más leve, el número de macrófagos derivados de monocitos en el colon de ratones deficientes para SLAMF1 y RAG se vio reducido en comparación con ratones deficientes para RAG ¹³⁹. Más aun, anticuerpos neutralizantes frente a SLAMF1 mitigan la gravedad enfermedad ¹³⁹, por lo que las interacciones SLAMF1-SLAMF1 en la superficie celular de macrófagos y monocitos probablemente desempeñen un papel en el desarrollo de colitis. Wang y col. reportaron que la migración de células mieloides durante la inflamación está regulada diferencialmente por los receptores SLAMF1 y SLAMF8, modulando positiva y negativamente la migración de CDs y macrófagos al sitio inflamado respectivamente ¹⁰⁴. Los autores concluyeron que estos receptores dirigen las respuestas inmunitarias innatas de las células mieloides a través de la producción de ROS mediada por la enzima NADPH oxidasa (NOX-2) ¹⁰⁴. Además se ha sugerido un rol de SLAMF1 en la citotoxicidad de células T frente a células derivadas de cáncer de colon ²³⁴.

Así, ha sido propuesto que SLAMF1 podría ser un nuevo blanco terapéutico en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales. El bloqueo de la respuesta inflamatoria puede disminuir la severidad de enfermedad en modelos animales. Sin embargo, una respuesta inflamatoria robusta en la CDI es necesaria para controlar el crecimiento bacteriano, pero debe ser regulada de manera de limitar el daño de los tejidos. Aunque la respuesta inmune adaptativa influencia la severidad de la CDI, la respuesta inmune innata posee un rol crucial en la progresión, y la resolución de la enfermedad.

Dado que la inmuno-patología en la CDI es esencialmente mediada por la respuesta inflamatoria, pero la misma es necesaria para la eliminación y control del patógeno, y que son muy pocos los estudios que exploran el rol de los macrófagos en este contexto y menos aun los que evalúan el rol de moléculas coestimuladoras, en este segundo capítulo estudiamos el rol de SLAMF1 y de los macrófagos en la infección por *Clostridioides difficile*. Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, SLAMF1 podría regular la respuesta inflamatoria, la migración y activación de los macrófagos y monocitos actuando como un sensor microbiológico o disparando diferentes vías de señalización. Así, nos propusimos estudiar si SLAMF1 podría actuar como un receptor inmune reconociendo directamente a *Clostridioides difficile* y/o como molécula coestimuladora modulando distintas funciones microbicidas de los macrófagos.

Mediante el diseño experimental propuesto se pretende trabajar con un modelo que facilite la comprensión del rol de SLAMF1 y de los macrófagos humanos en la CDI.

Objetivos



Objetivo General

El objetivo general de este capítulo es investigar los mecanismos involucrados en la activación y modulación de la función de los macrófagos durante la infección por *Clostridioides difficile*. Comprender cómo los macrófagos participan del proceso infeccioso podría ofrecer importantes herramientas para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos. En este segundo capítulo nos propusimos explorar el rol de la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAMF1) en la activación y función de los macrófagos en la respuesta inducida por *C. difficile*. *La activación y reclutamiento de macrófagos, así como la inducción de las funciones macrofágicas podría contribuir a la resolución de esta infección en etapas tempranas, colaborando con la generación de una respuesta inmune adaptativa eficiente y limitando el daño ocasionado por la fuerte respuesta proinflamatoria desregulada.*

Objetivos específicos

Objetivo 1- Caracterizar el perfil de expresión de SLAMF1 junto a marcadores de activación y viabilidad en macrófagos derivados de monocitos humanos de dadores sanos luego de estimulación *in vitro* con distintas cepas de *C. difficile* inactivadas por diferentes métodos físicos y químicos (calor y formol).

Objetivo 2- Determinar la existencia de interacción bioquímica entre SLAMF1 y distintas cepas de *C. difficile*.

Objetivo 3- Investigar el rol de SLAMF1 en la interacción de macrófagos humanos con distintas cepas de *C. difficile* en respuesta a la activación de SLAMF1 con un anticuerpo agonista.

Objetivo 4- Determinar la localización celular de distintas cepas de *C. difficile* evaluando la expresión de marcadores de superficie celular (CD14), SLAMF1 y marcadores endosomales tempranos y tardíos (EEA1 y LAMP2).

Objetivo 5- Estudiar la expresión de SLAMF1 en células mononucleares CD14 positivas provenientes de sangre periférica de pacientes con infección por *C. difficile* (CDI) y dadores sanos y la capacidad de éstas células de interaccionar con *C. difficile*.

Materiales y Métodos

Muestras humanas

Dadores sanos. Los monocitos humanos se obtuvieron a partir de muestras de sangre periférica de donantes sanos (DS) adultos. Luego fueron diferenciados a macrófagos. La distribución del grupo masculino/femenino fue 3/3 y la edad media de 36 años; rango intercuartil (IQR) 18-75 años.

Pacientes con CDI. Las muestras de sangre periférica fueron recolectadas de pacientes con CDI en distintos centros de salud (Clínica La Pequeña Familia y Clínica Centro) de la ciudad de Junín, Buenos Aires, Argentina. El diagnóstico de la infección por *C. difficile* se confirmó por test rápido para la detección simultánea de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) de *C. difficile* y los antígenos de las Toxinas A y B en heces humanas (Cat. No F41220, Savyon® Diagnostics Ltd., Israel). La distribución del grupo masculino/femenino fue 2/0 y la edad media fue de 44 años; IQR 18–75 años. La investigación se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (2013) promulgada por la Asociación Médica Mundial y aprobada por el Comité de Ética de la UNNOBA (COENOBA). Se obtuvieron consentimientos informados por escrito de todos los participantes antes de la recolección de la muestra.

Antígenos y cepas bacterianas

La estimulación *in vitro* de las células se realizó con la cepa hipervirulenta NAP1/BI/027 (CD) obtenida del Instituto Nacional de Microbiología Dr. Malbran-ANLIS y con una cepa endógena (End) obtenida de la flora comensal de ratones C57BL/6 SPF (libres de patógenos específicos) mantenidos en el bioterio de nuestro centro de investigación (CIBA, UNNOBA). La cepa End se detectó luego de generada la disbiosis intestinal con un coctel típico de antibióticos para modelos murinos de CDI *in vivo*. Brevemente, la disbiosis se induce utilizando Gentamicina (50 mg/ml), Metronidazol (5 mg/ml), Colistina (25 mg/ml) y Vancomicina (50 mg/ml) en la botella de agua de consumo por 3 días. Luego de dos días de agua libre de antibióticos se inyecta Clindamicina (10 mg/kg) por vía intraperitoneal. Esta cepa está siendo actualmente secuenciada y comparada con la cepa NAP-1/BI/027.

Ambas cepas de *C. difficile* fueron inactivadas por calor (CD Calor o End Calor) o con formol (CD Formol o End Formol). Brevemente, para la preparación de los extractos de *C. difficile*, se tomó una alícuota del caldo de cultivo de *C. difficile* (BHI Broth) y se centrifugó a 15000 rpm por 10 minutos a 4°C. En el caso del extracto de *C. difficile* inactivado por calor, se lavó el pellet de bacterias con PBS 1X centrifugando a 15000 rpm por 10 minutos a 4°C y se resuspendió en PBS

1X una vez descartado el sobrenadante. Posteriormente, se inactivó a 95°C por 30 minutos en termobloque. Para el extracto de *C. difficile* inactivado con formol, el pellet se resuspendió en formol 3% (Biopack, Bs. As, Argentina) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se centrifugó a 15000 rpm por 10 minutos, se lavó 3 veces con PBS 1X para remover el formol y se resuspendió en PBS 1X. Ambos extractos se almacenaron a -20°C. Antes del inicio de la preparación de los extractos, las bacterias se cultivaron por 48 horas en agar chocolate (**Fig.1**) y luego en medio líquido (BHI Broth) por 72 horas. Todos los cultivos se realizaron en jarras de anaerobiosis utilizando sobres de anaerobiosis (Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc, Japón). Se monitoreó el crecimiento bacteriano del cultivo (37°C en condiciones de anaerobiosis y oscuridad) midiendo la DO a 600 nm. Inicialmente se partió de una DO de 0,1 y se detuvo el crecimiento a una DO de 0,6. Una vez realizados los extractos, se cuantificó el contenido antigénico a 600 nm y se ajustó a una DO de 1 para una mayor paridad entre los extractos.



Fig. 1 Colonias aisladas de *C. difficile* en placa de Agar chocolate cultivadas en anaerobiosis

Para algunos experimentos, los extractos inactivados por calor fueron teñidos con el isómero I de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (cat. No. F7250, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Brevemente, las bacterias inactivadas resuspendidas en PBS se centrifugaron a 10000g durante 4 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se resuspendieron en buffer NaHCO_3 0,1M pH=9 con 1 mg/mL de la solución FITC- dimetilsulfóxido (DMSO) y se dejaron en agitación por 2 horas a 37°C en oscuridad. Finalmente, el exceso de FITC fue eliminado mediante lavados con PBS 1X y los extractos se resuspendieron en PBS 1X y se utilizaron para estimular las células.

Cultivo celular

Todos los experimentos se llevaron a cabo en una incubadora a 37 ° C y en una atmósfera con 5% de CO₂.

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de dadores sanos y pacientes con CDI se aislaron por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.).

Para ciertos experimentos, se cultivaron 1×10^6 CMSP por ml de medio de cultivo completo (medio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con L-glutamina (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), SBF al 10% (Gibco), 100 U / ml de penicilina y 100 μg / ml de estreptomina (Gibco)) por 24 horas.

Para obtener macrófagos derivados de monocitos, los monocitos se purificaron a partir de CMSP de dadores sanos mediante selección magnética positiva por CD14 (Miltenyi Biotec, Cat No. 130-097-052), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los casos, la pureza de las células aisladas fue superior al 95%. Se cultivaron $0,5 \times 10^6$ monocitos CD14 positivos por ml de medio de cultivo durante 2 horas en ausencia de SBF para promover la adherencia. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavados con RPMI precalentado y las células adherentes se cultivaron durante 16-18 horas adicionales en medio completo medio (RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, SBF al 10%, 100 U / ml de penicilina y 100 μg / ml de estreptomina).

Las CMSP y los macrófagos derivados de monocitos se estimularon con 10, 20 o 50 μl de los extractos de *C. difficile* cada 1×10^6 células (10 μl extracto = 1×10^6 bacterias) durante 24 horas en presencia o ausencia de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un anticuerpo agonista anti-SLAMF1 (clon A12, BioLegend, San Diego, CA, EE. UU). Para algunos experimentos, las células fueron estimuladas con 10, 20 o 50 μl de CD Calor FITC o 10 μl End Calor FITC (10 μl = 1×10^6 bacterias) por cada 1×10^6 células durante 24 horas.

Citometría de Flujo

Las CMSP y los macrófagos derivados de monocitos se recogieron mediante lavado exhaustivo con buffer FACS (PBS 1X - SBF 2%) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. Luego, las células se tiñeron con anticuerpos conjugados a fluorocromos anti-CD14 (anti-CD14 Alexa Fluor 647, Cat No. 325612, BioLegend), anti-SLAMF1 (anti-SLAMF1 PE, Cat No. 306308, BioLegend o, anti-SLAMF1 Alexa Fluor 488 Cat No. 306312, BioLegend), anti-CD163 (anti-CD163 PE, Cat No. 12-1639-42, eBiosciences, Inc.).

Para la detección de TNF- α , en las últimas 5 horas de cultivo se adicionó un inhibidor de transporte del aparato de Golgi (GolgiStop, BD Biosciences) para inducir la acumulación intracelular de la citoquina. Las células fueron lavadas en buffer FACS y luego incubadas con anticuerpos monoclonales específicos para las moléculas de superficie a determinar durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células fueron lavadas con buffer FACS y centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich) por 20 minutos. Posteriormente, se realizaron dos

lavados con buffer de permeabilización (BP; PBS 1X, SBF 10%, Saponina 0,5%) y una incubación con BP durante 15 minutos. Luego, se incubaron por 40 minutos con un anticuerpo específico anti-TNF- α PE (Immunotools, Friesoythe, Alemania). Las células fueron lavadas dos veces con BP y resuspendidas en FACS. En paralelo con todos los experimentos, las muestras se incubaron con anticuerpos monoclonales irrelevantes (isotipos). Todas las muestras se tiñeron con un colorante de viabilidad (Fixable Viability Dye eFluor™ 780 Cat No. 65-0865, eBioscience™) para excluir las células muertas del análisis. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) y el análisis de datos se realizó usando FlowJo 7.6.2 (Tree Star Inc., OR, EE. UU.).

Ensayos de interacción entre SLAMF1-C. *difficile*

La interacción bioquímica entre SLAMF1 y *C. difficile* se evaluó mediante dos metodologías diferentes como se describió en el capítulo 1 para *M. tuberculosis*. Se prepararon extractos proteicos totales en condiciones no desnaturalizantes de macrófagos derivados de monocitos de dadores sanos. La expresión de SLAMF1 se corroboró por citometría de flujo previamente a la preparación de los extractos proteicos. Brevemente, se cosecharon 1×10^6 macrófagos y se usaron 100 μ l de buffer RIPA suplementado con PMSF (1 mM) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich Cat. No P8340) para la lisis celular. La suspensión se incubó en hielo durante 1 h, se agitó con vortex cada 10 minutos y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos.

Para la determinación por citometría de flujo, se siguieron los mismos pasos descriptos en el capítulo 1. En este caso el extracto de proteínas totales se incubó con 10 μ l de CD Calor o CD Formol (10 μ l = 1×10^6 bacterias). La interacción de SLAMF1-C. *difficile* por microscopía de fluorescencia se realizó adhiriendo 10 μ l (1×10^6 bacterias) de CD Calor FITC o End FITC en los portaobjetos de vidrio pretratados con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 37°C. Luego se continuó con la tinción siguiendo los pasos descriptos en el Capítulo 1.

Microscopía de Fluorescencia

Los macrófagos derivados de monocitos se incubaron 2×10^5 células/pocillo en microplacas (Nunc) como se describió anteriormente. Las células fueron estimuladas con CD Calor FITC o End FITC. Las células se fijaron con PFA al 4% durante 20 minutos, se lavaron con solución salina y se permeabilizaron con buffer que contenía PBS 1X, SBF al 10% y saponina al 0,5%. Posteriormente, las células se incubaron con un anticuerpo específico anti-SLAMF1 de ratón (clon A12, BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.) seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor

647 (Cat. No 4410S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU). Para detectar los compartimentos endosomales / lisosomales, las células se marcaron con un anticuerpo específico anti-EEA1 (Cat No. 610456, BD Biosciences) o anti-LAMP2 (Cat No. 555803, BD Biosciences) de ratón seguidos de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 546 (Cat No. A21123, Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.). Para detectar CD14, se empleó un anticuerpo anti-CD14 conjugado a Alexa Fluor 647 (Cat No. 325612, BioLegend). En todos los casos, los portaobjetos se montaron con PolyMount (Polysciences) y se evaluaron con microscopio de fluorescencia trinocular Axio Imager.A2 (Carl Zeiss, Alemania). Se analizaron al menos 100 células por campo y 5 campos por tratamiento en tres experimentos independientes.

Análisis estadístico

Como se indica en las leyendas de las figuras, la prueba de Friedman con la prueba post hoc corregida de Dunn se utilizó para la comparación entre grupos experimentales, la prueba de Mann-Whitney para analizar las diferencias entre las muestras no pareadas y las comparaciones entre dos grupos se evaluaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, CA, EE. UU.) Para todas las comparaciones estadísticas, se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados



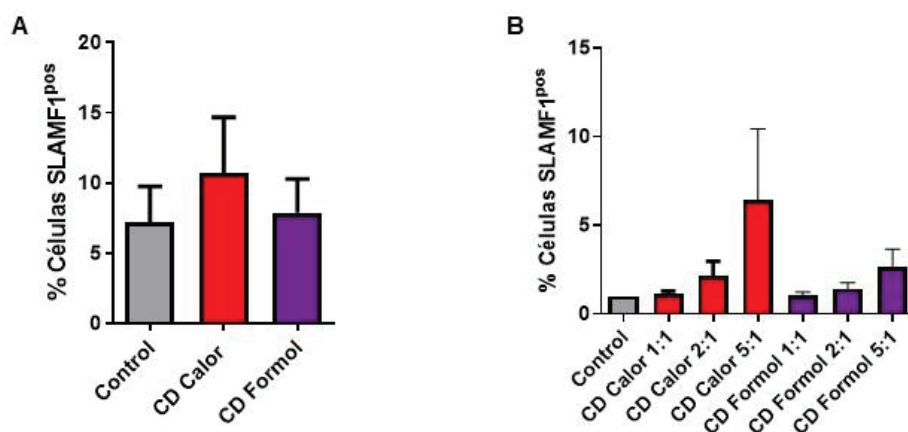
La cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* no induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos

La expresión de SLAMF1 frente a antígenos de bacterias Gram positivas ha sido evaluada previamente, observándose un aumento en monocitos humanos estimulados con peptidoglicano y ácido lipoteicoico de *S. aureus*⁷⁹ pero no frente a *L. acidophilus* y *S. aureus* en CDs murinas²³⁵. Sin embargo, la modulación de SLAMF1 frente a *C. difficile* aún no ha sido abordada.

Nuestros resultados muestran que la cepa hipervirulenta NAP1/BI/027 de *C. difficile* inactivada por calor o formol (CD Calor o CD Formol) no fue capaz de inducir la expresión de SLAMF1 en la superficie de macrófagos derivados de monocitos de donadores sanos (**Fig. 1A**). Con el fin de evaluar si mayores cantidades de bacteria presentes en el cultivo celular podían modular positivamente la expresión de SLAMF1, estimulamos macrófagos con relaciones 2:1 y 5:1 de bacteria:macrófago (**Fig. 1B**). A pesar de observar un leve incremento en los niveles de SLAMF1 luego de exponer las células a CD Calor o CD Formol, los resultados no fueron significativos (**Fig. 1B**).

Como ha sido propuesto que el receptor tipo scavenger CD163 se asocia a perfiles alternativos en macrófagos²³⁶ y ha sido relacionado con enfermedades intestinales como IBD y enfermedad de Crohn²³⁶⁻²³⁸, evaluamos la expresión de CD163 de superficie en macrófagos expuestos a *C. difficile* (**Fig. 1C-D**). Los niveles de CD163 fueron muy bajos tanto en los macrófagos sin estimular como en los estimulados con CD Calor y CD Formol (**Fig. 1C**) y su expresión no fue modulada en presencia de cantidades crecientes de *C. difficile* (**Fig. 1D**).

Para comprobar que los efectos observados al utilizar mayores cantidades de bacteria no eran causa de una inducción de la muerte celular, evaluamos la viabilidad de los macrófagos empleando el colorante de viabilidad FVD eFluor780 mediante citometría de flujo (**Fig. 1E**). El porcentaje de macrófagos viables no sufrió cambios al utilizar las distintas relaciones bacteria:macrófago (**Fig. 1E**), indicando que *C. difficile* inactivada por calor o formol no induce la expresión de SLAMF1 ni de CD163 en la superficie de macrófagos derivados de monocitos humanos.



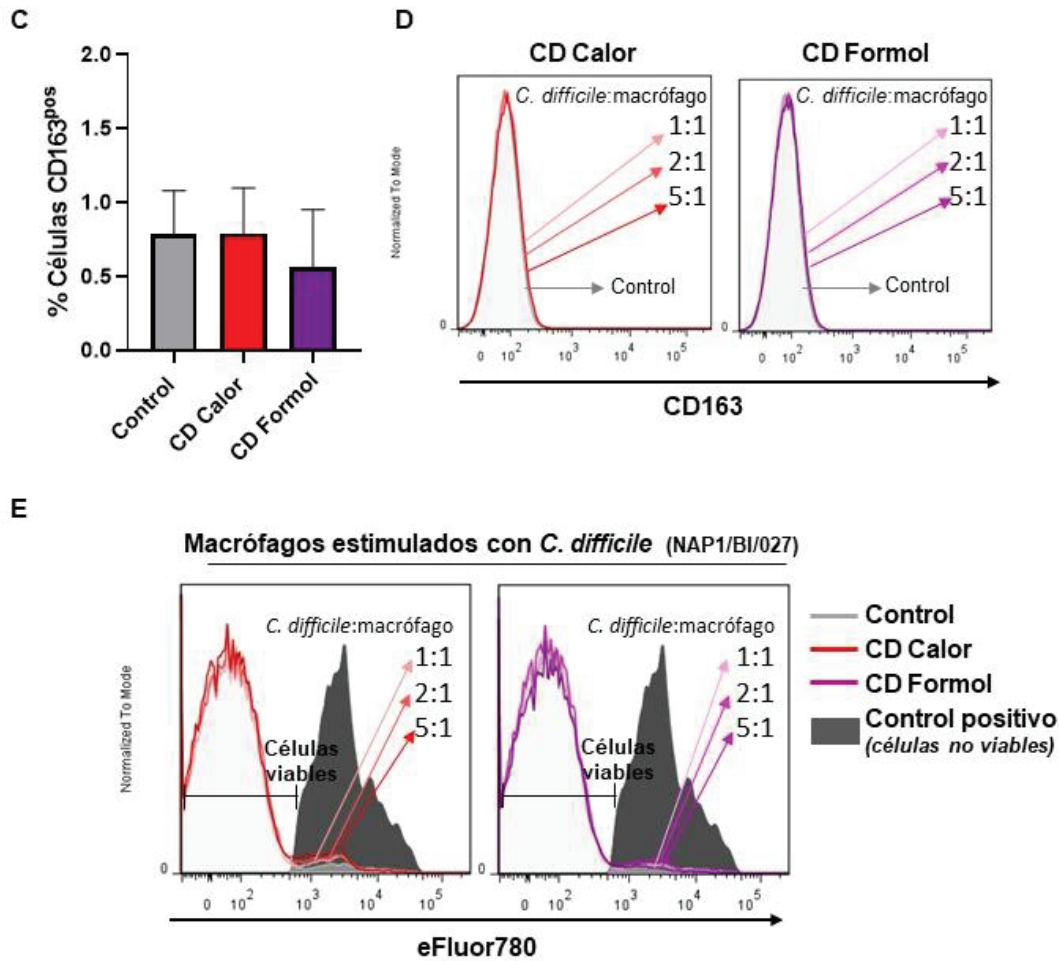


Fig. 1 Expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos estimulados con *C. difficile* (NAP1/BI/027). (A-E) Los monocitos CD14 positivos se obtuvieron a partir de sangre periférica de donadores sanos mediante selección magnética positiva. Después de la adherencia e incubación en medio completo durante 16-18 horas, los macrófagos se estimularon con relación 1:1 de la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* inactivada por calor o formol (CD Calor o CD Formol) durante 24 horas y (A-B) la expresión de SLAMF1 se evaluó mediante citometría de flujo. (B) Se muestra el porcentaje de células SLAMF1 positivas estimuladas con relaciones 1:1, 2:1 y 5:1 de *C. difficile*:macrófagos relativizado a los macrófagos sin estimular (control). (C-D) Niveles de CD163 expresado en superficie de macrófagos estimulados con relaciones 1:1 (C y D), 2:1 y 5:1 (D) de *C. difficile*:macrófagos evaluados por citometría de flujo. (D) Histograma representativo de 3 experimentos independientes. (E) La viabilidad de los macrófagos se determinó empleando un colorante de viabilidad (FVD eFluor780) que marca irreversiblemente las células muertas. Se utilizaron células muertas por calor para los controles de compensación. En todos los casos, la viabilidad celular fue superior al 93%.

1: 1, 10 μ l de CD Calor o CD Formol / 1×10^6 células (10 μ l = 1×10^6 bacterias)

20 μ l de CD Calor o CD Formol / 1×10^6 células (20 μ l = 2×10^6 bacterias)

50 μ l de CD Calor o CD Formol / 1×10^6 células (50 μ l = 5×10^6 bacterias)

(A-C) Las barras representan la media \pm SEM. A y C, Prueba de suma de rangos de Wilcoxon. B, prueba de Friedman con prueba post hoc corregida de Dunn

SLAMF1 no interactúa con la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile*

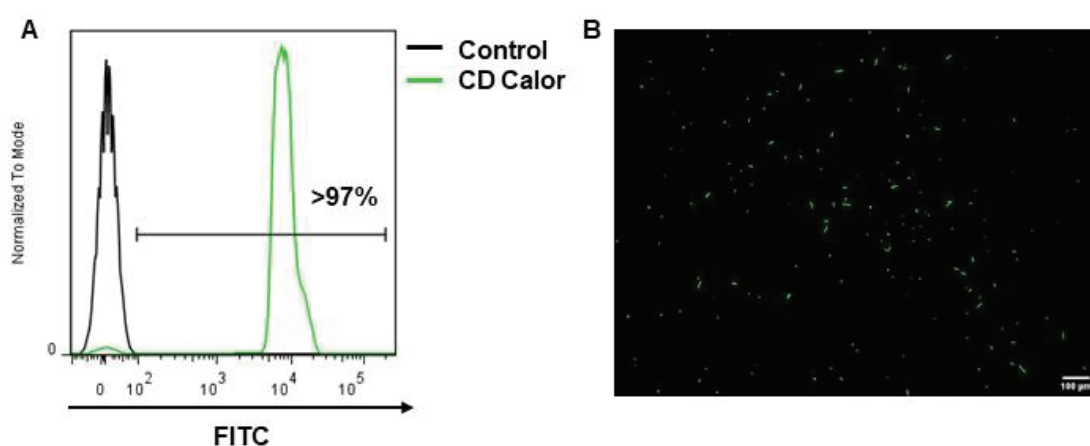
El reconocimiento de patógenos mediado por SLAMF1 ha sido descrito para virus^{70,71} y bacterias

Gram negativas^{67,72,73} y ha sido propuesto para parásitos⁶⁹ y para *M. tuberculosis* en el capítulo

uno de este trabajo. Esta función ha sido descartada para *S. aureus*⁶⁷, pero no ha sido estudiada para otras bacterias Gram positivas.

Para evaluar la interacción directa de *C. difficile* con SLAMF1, en primera instancia acoplamos la cepa NAP1/BI/027 inactivada por calor al isómero I de FITC (**Fig. 2A-B**). La proporción de CD Calor acoplada al fluoróforo fue evaluada por citometría de flujo y microscopia de fluorescencia, observándose que casi la totalidad de bacterias resultaron positivas para FITC (**Fig. 2A-B**). Luego realizamos ensayos de interacción bioquímica. Para esto, incubamos extractos de proteínas totales de macrófagos derivados de monocitos que expresaban SLAMF1 con los extractos de la bacteria (CD Calor y CD Formol) (**Fig. 2D**). La expresión de SLAMF1 en las células utilizadas para obtener los extractos proteicos fue corroborada por citometría de flujo (**Fig. 2C**). Después de un tratamiento de crosslinking, no detectamos tinción positiva para SLAMF1 (**Fig. 2D**) mediante citometría de flujo.

Además, estudiamos la interacción SLAMF1-*C. difficile* adhiriendo CD Calor acoplado a FITC a portaobjetos recubiertos con poli-D-lisina. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron con extractos de proteínas totales de macrófagos derivados de monocitos. Después del tratamiento de crosslinking, SLAMF1 se detectó por microscopía de fluorescencia. Acordando con los resultados obtenidos por citometría de flujo, no se observó interacción entre *C. difficile* inactivada por calor y SLAMF1 como se muestra en la superposición (merge) de las imágenes (**Fig. 2E**). Al igual que en el capítulo uno, se realizaron controles de unión inespecífica del anticuerpo primario (anti-SLAMF1) y secundario utilizados que permitieron corroborar la especificidad del ensayo.



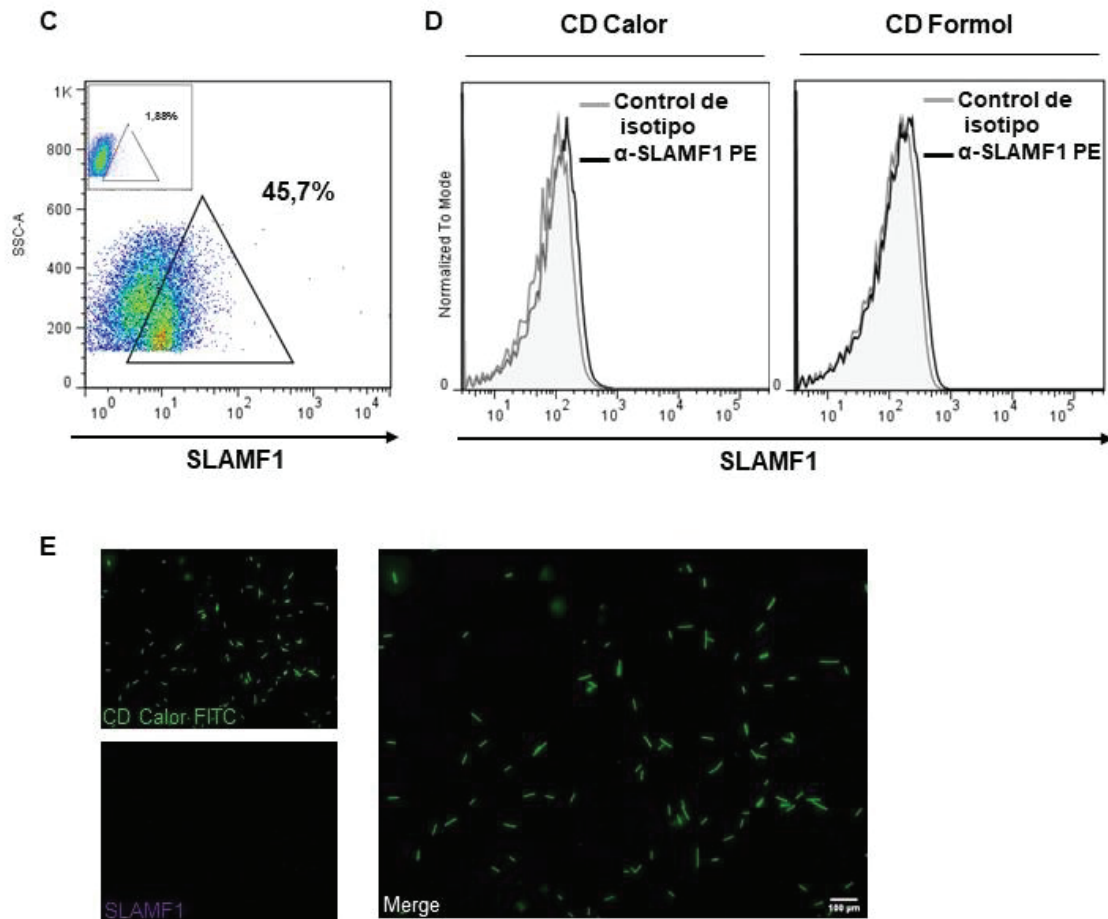


Fig. 2 Interacción SLAMF1-*C. difficile* (NAP-1/BI/07). (A-B) *C. difficile* inactivada por calor (DO=1) fue acoplada a FITC en buffer carbonato por 2 horas, lavada y resuspendida en PBS 1X. La eficiencia de la tinción se evaluó por citometría de flujo (A) y por microscopia de fluorescencia con objetivo 20X (B). (C) Expresión de SLAMF1 en macrófagos derivados de monocitos utilizados para generar extractos de proteínas totales en condiciones no desnaturizantes mediante citometría de flujo. (D) Los extractos de proteínas se incubaron con 1×10^6 células enteras de *C. difficile* inactivada por calor o formol (CD Calor o CD Formol). Después del crosslinking con formaldehído, glicina y EGS, se detectó SLAMF1 por citometría de flujo utilizando anticuerpo específico anti-SLAMF1 conjugado a PE. Se muestra un histograma representativo. (E) $10 \mu\text{l}$ (1×10^6 bacterias) de *C. difficile* inactivada por calor acoplada a FITC (CD Calor FITC) se adhirieron en portaobjetos pretratados con poli-D-lisina. Después del bloqueo, los portaobjetos se incubaron con extractos de proteínas totales. El crosslinking se realizó con formaldehído, glicina y EGS y se utilizó un anticuerpo específico de ratón anti-SLAMF1 humano y un anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 647 para la detección de SLAMF1. Los portaobjetos se montaron y analizaron usando un objetivo 40X de un microscopio de fluorescencia trinocular. Se muestran las imágenes individuales para cada canal de fluorescencia y la fusión (merge) de las mismas. Barra de escala: $100 \mu\text{m}$

Los resultados de las pruebas bioquímicas demuestran que SLAMF1 no interactúa con *C. difficile* y sugieren que SLAMF1 no actúa como sensor microbiológico de esta bacteria.

La cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* interactúa con los macrófagos humanos por un mecanismo independiente de SLAMF1.

Al observar que SLAMF1 no modifica su expresión frente a *C. difficile* y que tampoco interactúa con la bacteria, decidimos evaluar si la coestimulación a través de SLAMF1 utilizando un anticuerpo agonista podría tener algún efecto sobre la interacción con *C. difficile*.

Como demostramos en el capítulo uno, las interacciones homofílicas SLAMF1-SLAMF1 indujeron la internalización de *M. tuberculosis*. Es decir que SLAMF1 promueve la interacción entre los macrófagos humanos y *M. tuberculosis* independientemente del reconocimiento de la bacteria. Para evaluar si SLAMF1 también era capaz de modular la interacción con *C. difficile*, los macrófagos derivados de monocitos fueron cultivados en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista para SLAMF1 (α -SLAMF1 (A12)) y estimulados con *C. difficile* inactivada con calor acoplada a FITC (CD Calor FITC). Al analizar el número de células interactuando con *C. difficile* por citometría de flujo no observamos diferencias cuando la señalización de SLAMF1 fue activada con el anticuerpo agonista respecto de los macrófagos que no habían sido expuestos a α -SLAMF1 (**Fig. 3A-B**). Apoyando estos resultados, macrófagos evaluados por microscopía de fluorescencia tampoco mostraron diferencias en su capacidad de interactuar con *C. difficile* inactivada con calor acoplada a FITC (**Fig. 3C-D**).

Más aun, cuando determinamos la expresión de SLAMF1 en los macrófagos que estaban interactuando con *C. difficile* por citometría de flujo, observamos un porcentaje muy bajo de células positivas para SLAMF1 (**Fig. 3 E**). De hecho, la mayoría de los macrófagos que expresaron SLAMF1 no estaban interactuando con la bacteria y, del mismo modo, la mayoría de las células interactuando con *C. difficile* no expresaron SLAMF1 (**Fig. 3 E**). Por otro lado, al estimular los macrófagos con cantidades crecientes de CD Calor FITC observamos que los macrófagos incrementaron su capacidad de interactuar con las bacterias (**Fig. 3F**). Estos resultados indicarían que los macrófagos humanos son capaces de fagocitar a *C. difficile* por mecanismos independientes de SLAMF1.

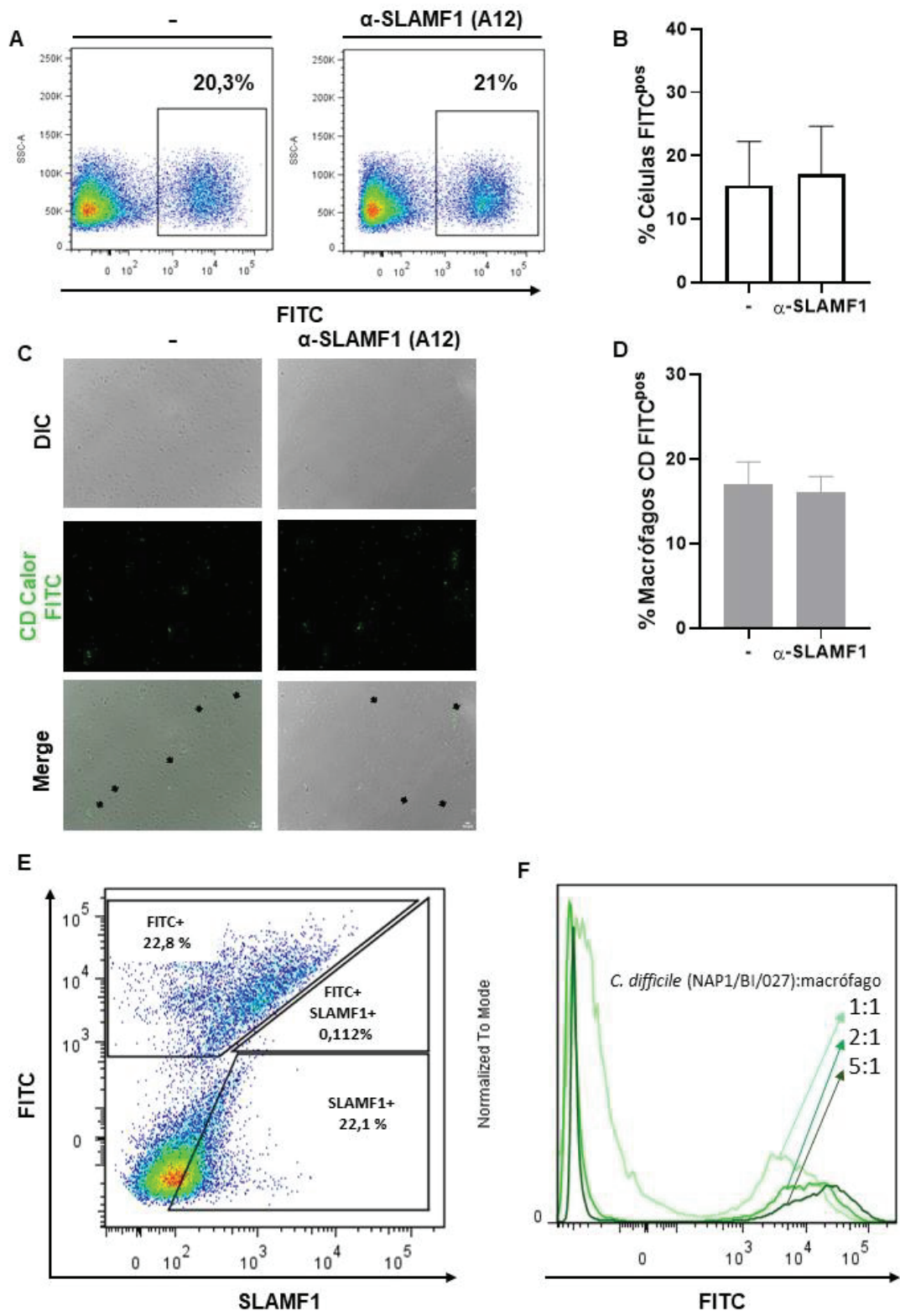


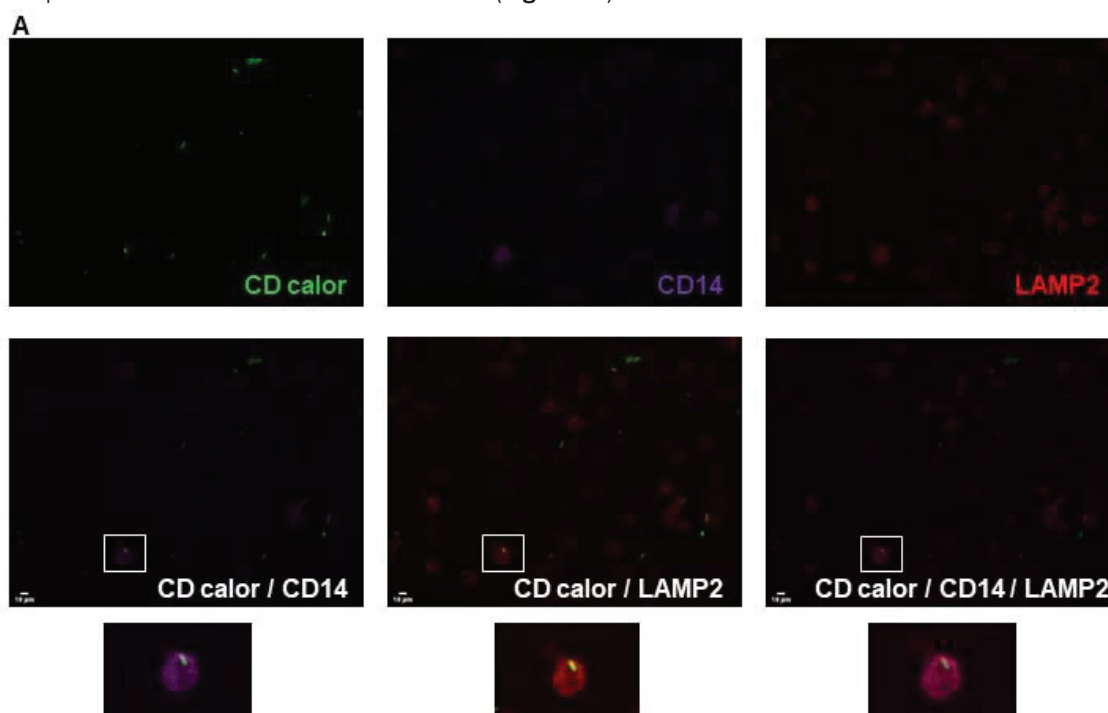
Fig. 3 Rol de SLAMF1 en la interacción macrófagos-*C. difficile* (NAP1/BI/027). (A-D) Macrófagos de dadores sanos se estimularon con *C. difficile* inactivada con calor acoplada a FITC (CD Calor FITC) por 24 horas en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista α -SLAMF1. Se muestra un gráfico de puntos representativo de 3 experimentos independientes (A) y la cuantificación correspondiente a los porcentajes de células FITC positivas como medida de interacción entre los macrófagos y *C. difficile* en los gráficos de barras (B). (C) Micrografías representativas de 3 experimentos independientes tomadas con objetivo 20X y (D) porcentaje de células interactuando con *C. difficile* evaluado por microscopía de fluorescencia. (E) Grafico de puntos representativo del porcentaje de células positivas para FITC, positivas para SLAMF1 y dobles positivas. (F) Histograma representativo de macrófagos derivados de monocitos estimulados por 24 horas con cantidades crecientes de *C. difficile* en relación a la cantidad de macrófagos, donde el porcentaje de células FITC positivas en la relación 1:1 corresponde al 24,45 %, en la relación 2:1 al 38,7 % y en la relación 5:1 al 54,1%.

Barras de escala: 10 μ m

B y D, Las barras representan la media \pm SEM. B, prueba de Wilcoxon. D, prueba de Mann-Withney.

C, Las flechas señalan *C. difficile* sin interaccionar con macrófagos.

Posteriormente decidimos evaluar la localización celular de *C. difficile* por microscopia de fluorescencia, para lo cual empleamos marcadores de superficie como CD14 y endosomales tempranos y tardíos (EEA1 y LAMP2) (Fig. 4). Observamos que algunas bacterias permanecían en el espacio extracelular y que la mayoría estaban presentes en células CD14 positivas o LAMP2 positivas (Fig. 4A). Si bien es necesario realizar microscopia confocal para confirmar la internalización de la bacteria, proponemos que la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* puede interactuar con los macrófagos humanos y podría ser endocitada por algún mecanismo independiente de SLAMF1. Pudimos confirmar los resultados obtenidos por citometría de flujo (Fig. 3E) ya que, al observar los macrófagos, la mayoría de las células positivas para SLAMF1 no contenían bacterias (Fig. 4B). Curiosamente, detectamos que *C. difficile* induce una mayor proporción de células que forman endosomas tardíos en comparación con endosomas tempranos a las 24 horas de estimulación (Fig. 4C-D).



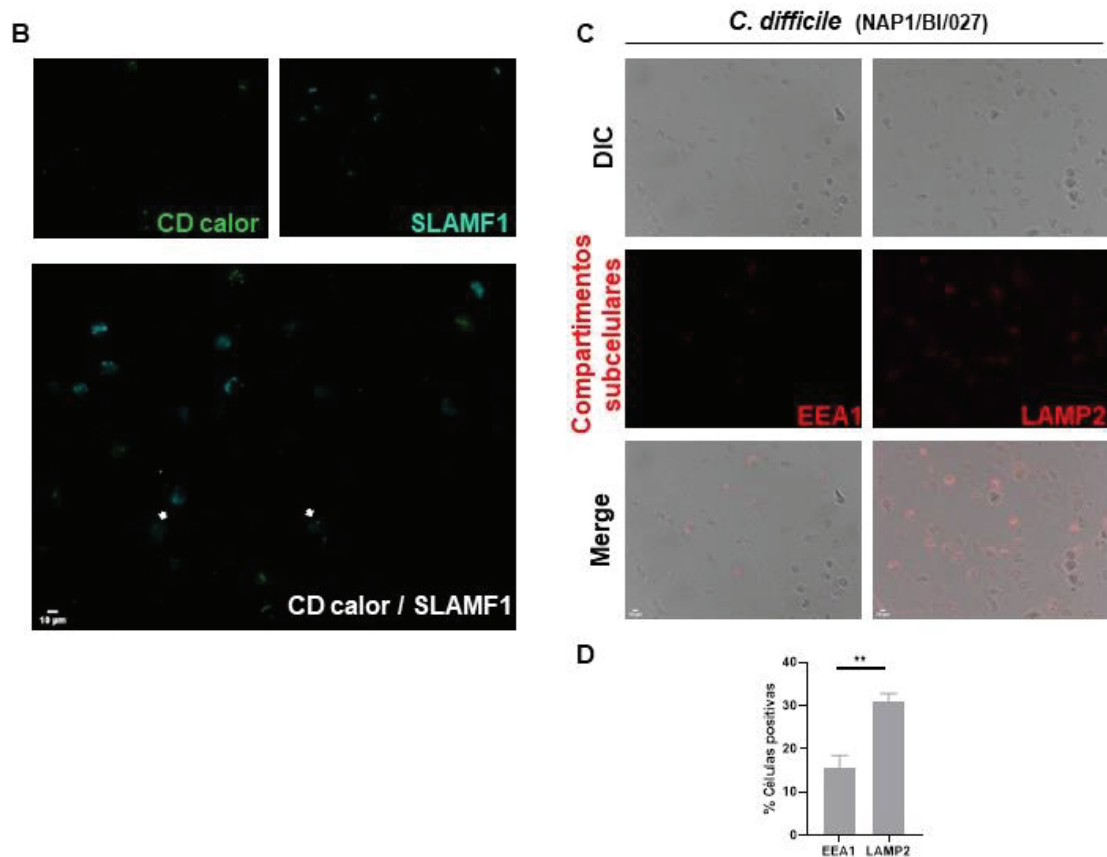


Fig. 4 Localización celular de la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile*. (A-D) Macrófagos de dadores sanos se estimularon con *C. difficile* inactivada con calor acoplada a FITC (CD Calor FITC) por 24 horas. Se muestran micrografías tomadas con un objetivo 40X representativas de 3 experimentos independientes. Para la detección de CD14 (A), EEA1 (C), LAMP2 (A y C) y SLAMF1 (B) se utilizaron anticuerpos específicos de ratón anti-CD14, anti-EEA1, anti-LAMP2 o anti-SLAMF1 humano, seguido de anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a Alexa Fluor 647 (magenta para CD14, cyan para SLAMF1) o Alexa Fluor 546 (rojo para EEA1 y LAMP2). La detección de las moléculas se realizó después de la fijación y permeabilización de los macrófagos. DIC, contraste de interferencia diferencial. (D) Las barras representan la media \pm SEM del porcentaje de células positivas para EEA1 o LAMP2.

Barras de escala: 10 μ m

B, Las flechas señalan *C. difficile* interactuando con macrófagos SLAMF1 positivos

** , $p < 0.01$. D, prueba de Mann-Withney

En conjunto, estos resultados sugieren que *C. difficile* es internalizada por los macrófagos pero que SLAMF1 no promueve la interacción entre macrófagos y la cepa hipervirulenta de *C. difficile* y que no participaría en el proceso de internalización de la bacteria.

La cepa endógena de *C. difficile* no induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos

Recientemente, nuestro laboratorio de investigación ha puesto a punto un modelo de infección *in vivo* de *C. difficile* en ratones C57BL/6 para el estudio de respuestas inmunes durante la CDI. Curiosamente, hemos observado presencia de *C. difficile* luego de realizar disbiosis de la microbiota intestinal utilizando un coctel de antibióticos, previo a la infección con la cepa

NAP1/BI/027. La presencia de esta cepa de *C. difficile* fue confirmada en muestras de materia fecal por enzimoimmunoanálisis y ha demostrado ser toxigénica (Fig. 5A). También ha sido cultivada en agar sangre (Fig. 5B) y CHROMagar™ para *C. difficile* (Fig. 5D) y teñida mediante coloración de Gram (Fig. 5C). Finalmente, para poder realizar los extractos de esta cepa endógena inactivados por calor y formol, las colonias a amplificar se seleccionaron a partir de placas de CHROMagar™. Esta cepa está siendo actualmente secuenciada para realizar un análisis más profundo de las características patogénicas, sin embargo, estos ensayos demuestran que es una cepa endógena productora de toxinas.

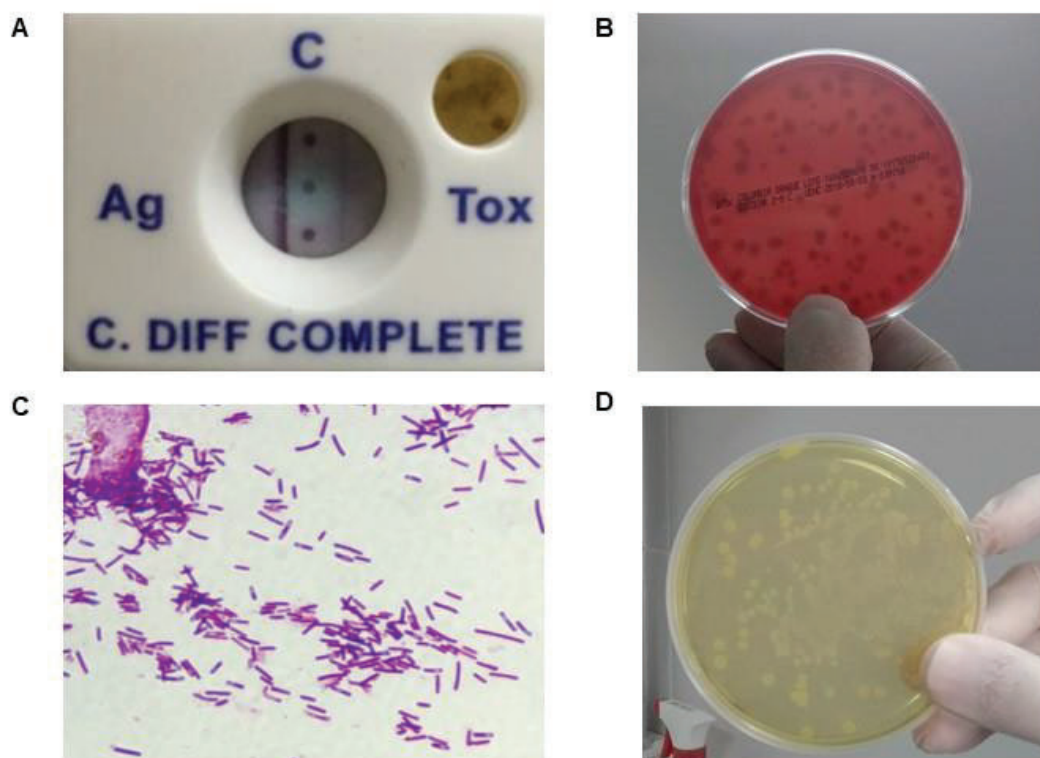


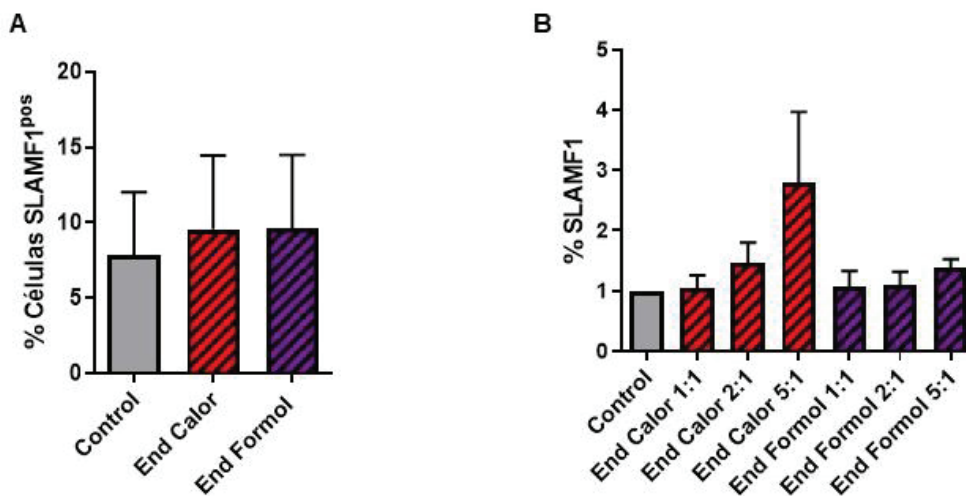
Fig. 5 Obtención de la cepa endógena de *C. difficile*. (A) Enzimoimmunoanálisis (EIA) rápido para la detección simultánea de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) conservada de *C. difficile* y los antígenos de la Toxina A y Toxina B en heces de ratones luego de la disbiosis. (B) Crecimiento de *C. difficile* en placa de agar sangre. (C) Tinción de Gram positiva a partir de una colonia de *C. difficile* luego del crecimiento en placa de agar sangre. Se pueden observar esporas típicas en posición sub-terminal. (D) Crecimiento de *C. difficile* en placa de CHROMagar™.

Ha sido descrito que la colonización del intestino con cepas endógenas de *C. difficile* resultaría protectora frente a la infección causada por esta bacteria²³⁹. Sin embargo, el rol de la respuesta inmune sobre los efectos protectivos ha sido poco abordado. Con este objetivo, decidimos evaluar la modulación de las respuestas macrofágicas por esta cepa aislada en nuestro laboratorio.

Al estimular macrófagos derivados de monocitos de donadores sanos con la cepa endógena de *C. difficile* (End) inactivada por calor o formol (End Calor o End Formol) por 24 horas, la expresión en superficie de SLAMF1 no presentó cambios respecto a macrófagos sin estimular (Fig. 6A). Cantidades crecientes de *C. difficile* endógena tampoco indujeron la expresión de SLAMF1 (Fig. 6B). A pesar de que End Calor muestra un mayor impacto sobre la expresión de SLAMF1 en la relación más alta *C. difficile* End:macrófago, las diferencias no fueron significativas (Fig. 6B).

También evaluamos si la expresión de CD163 sufría modificaciones en presencia de *C. difficile* endógena inactivada con calor o formol (End Calor o End Formol) luego de 24 horas (Fig. 6C-D). Los niveles de ésta molécula fueron menores al 3% en todos los casos cuando los macrófagos fueron estimulados con relación 1:1 de *C. difficile* End:macrófago (Fig. 6C) y no se modificaron en presencia de relaciones 2:1 y 5:1 (Fig. 6D).

Además, comprobamos que el estímulo de los macrófagos con las relaciones 1:1, 2:1 y 5:1 *C. difficile* End:macrófago no produjo cambios en la viabilidad de las células luego de 24 horas, evaluado por citometría de flujo empleando el colorante FVD eFluor780 (Fig. 6E).



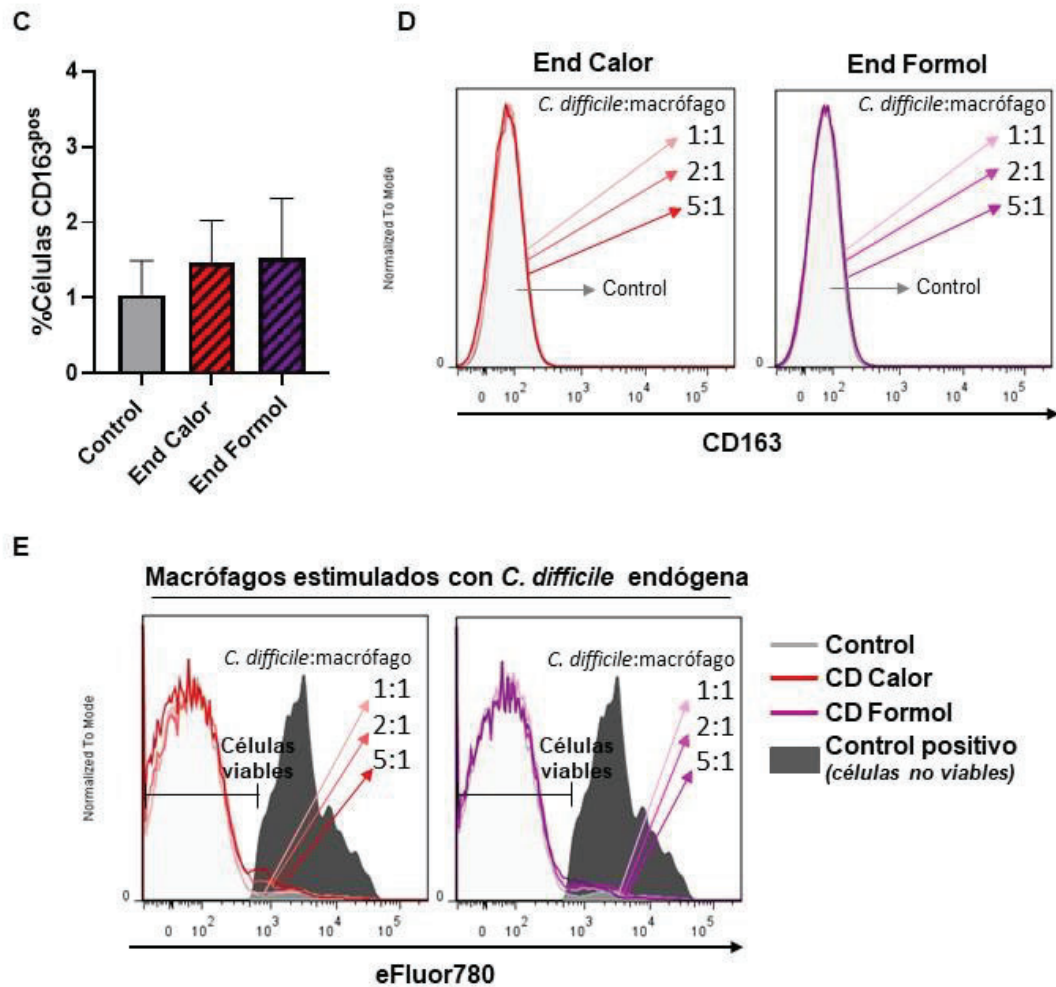


Fig. 6 Expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos estimulados con *C. difficile* endógena. (A-E) Los monocitos CD14 positivos se obtuvieron a partir de sangre periférica de dadores sanos mediante selección magnética positiva. Después de la adherencia e incubación en medio completo durante 16-18 horas, los macrófagos se estimularon con relación 1:1 de la cepa endógena de *C. difficile* inactivada por calor o formol (End Calor o End Formol) durante 24 horas y (A-B) la expresión de SLAMF1 se evaluó mediante citometría de flujo. (B) Se muestra el porcentaje de células SLAMF1 positivas estimuladas con relaciones 1:1, 2:1 y 5:1 de *C. difficile*:macrófagos relativizado a los macrófagos sin estimular (control). (C-D) Niveles de CD163 expresado en superficie de macrófagos estimulados con relaciones 1:1 (C y D), 2:1 y 5:1 (D) de *C. difficile*:macrófagos evaluados por citometría de flujo. (D) Histograma representativo de 3 experimentos independientes. (E) La viabilidad de los macrófagos se determinó empleando un colorante de viabilidad (FVD eFluor780) que marca irreversiblemente las células muertas. Se utilizaron células muertas por calor para los controles de compensación. En todos los casos, la viabilidad celular fue superior al 93%.

1: 1, 10 μ l de End Calor o End Formol / 1 x 10⁶ células (10 μ l = 1 x 10⁶ bacterias)

20 μ l de End Calor o End Formol / 1 x 10⁶ células (20 μ l = 2 x 10⁶ bacterias)

50 μ l de End Calor o End Formol / 1 x 10⁶ células (50 μ l = 5 x 10⁶ bacterias)

(A-C) Las barras representan la media \pm SEM. A y C, Prueba de suma de rangos de Wilcoxon. B, prueba de Friedman con prueba post hoc corregida de Dunn

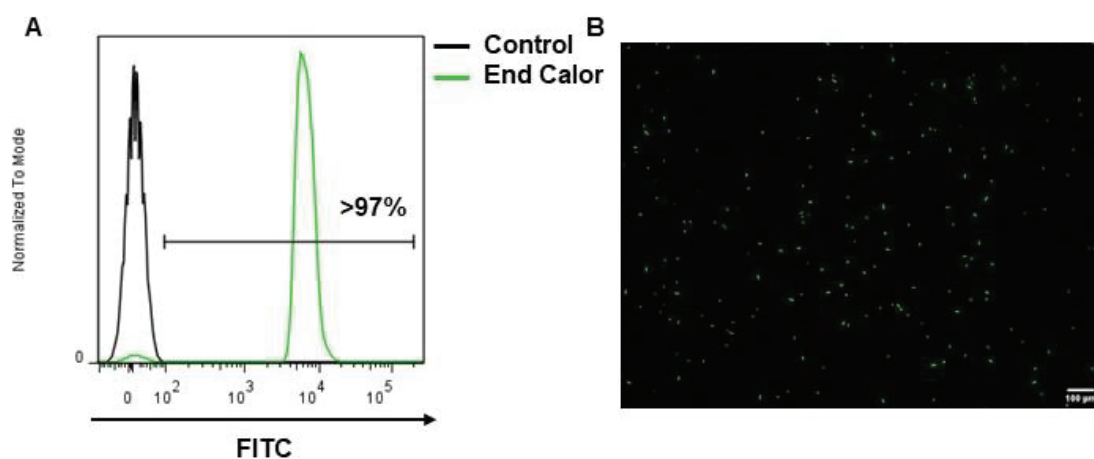
Por lo tanto, la cepa endógena de *C. difficile* se comporta como la cepa NAP1/BI/027 en cuanto a la modulación de SLAMF1 y CD163 en superficie como así también en el impacto sobre la viabilidad de los macrófagos, considerando las relaciones de estimulación y tiempos utilizados en este trabajo.

SLAMF1 no interactúa con la cepa endógena de *C. difficile*

Con la hipótesis de que, a diferencia de la cepa NAP1/BI/027, la cepa endógena podría ser reconocida por SLAMF1, realizamos un ensayo de interacción bioquímica.

Para esto, acoplamos *C. difficile* endógena inactivada por calor al isómero I de FITC (**Fig. 2 A-B**). Corroboramos la eficiencia de la tinción por citometría de flujo (**Fig. 7A**), observándose que más del 97% de las bacterias resultaron FITC positivas y, además, realizamos observación por microscopía de fluorescencia (**Fig. 7B**).

Para evaluar la interacción directa de *C. difficile* endógena con SLAMF1, realizamos un ensayo de interacción bioquímica analizando por microscopía de fluorescencia. Primero, adherimos *C. difficile* endógena inactivada por calor acoplada a FITC (End Calor FITC) a portaobjetos recubiertos con poli-D-lisina. Luego, los portaobjetos se incubaron con extractos de proteínas totales provenientes de macrófagos derivados de monocitos. Se utilizó el mismo extracto proteico que en la **Fig. 2**, en los cuales se había evaluado la expresión de SLAMF1 y mostraron una expresión mayor al 40% (**Fig. 2C**). Finalmente, se realizó el tratamiento de crosslinking y SLAMF1 se detectó por microscopía de fluorescencia. Al analizar la superposición de micrografías observamos que no existe interacción entre *C. difficile* endógena inactivada por calor y SLAMF1 (**Fig. 7C**). Los controles de unión inespecífica del anticuerpo primario (anti-SLAMF1) y secundario corroboraron la especificidad del ensayo.



C

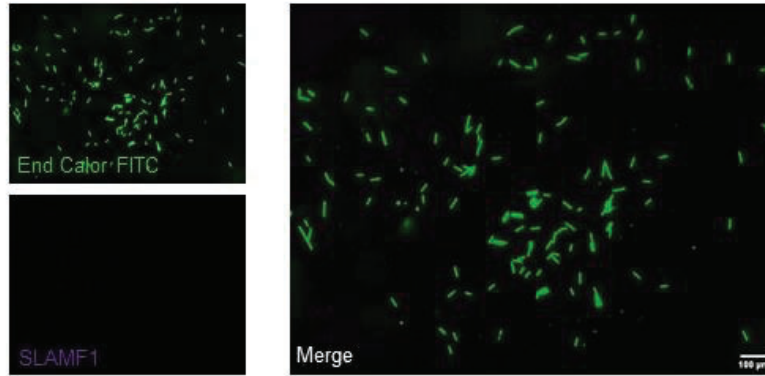


Fig. 7 Interacción SLAMF1-*C. difficile* endógena. (A-B) *C. difficile* endógena inactivada por calor (DO=1) fue acoplada a FITC en buffer carbonato por 2 horas, lavada y resuspendida en PBS 1X. La eficiencia de la tinción se evaluó por citometría de flujo (A) y por microscopia de fluorescencia con objetivo 20X (B). (C) 10 µl (1×10^6 bacterias) de *C. difficile* endógena inactivada por calor acoplada a FITC (End Calor FITC) se adhirieron en portaobjetos pretratados con poli-D-lisina. Después del bloqueo, los portaobjetos se incubaron con extractos de proteínas totales provenientes de macrófagos derivados de monocitos que expresaban SLAMF1. El crosslinking se realizó con formaldehído, glicina y EGS y se utilizó un anticuerpo específico de ratón anti-SLAMF1 humano y un anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 647 para la detección de SLAMF1. Los portaobjetos se montaron y analizaron usando un objetivo 40X de un microscopio de fluorescencia trinocular. Se muestran las imágenes individuales para cada canal de fluorescencia y la fusión (merge) de las mismas. Barra de escala: 100 µm

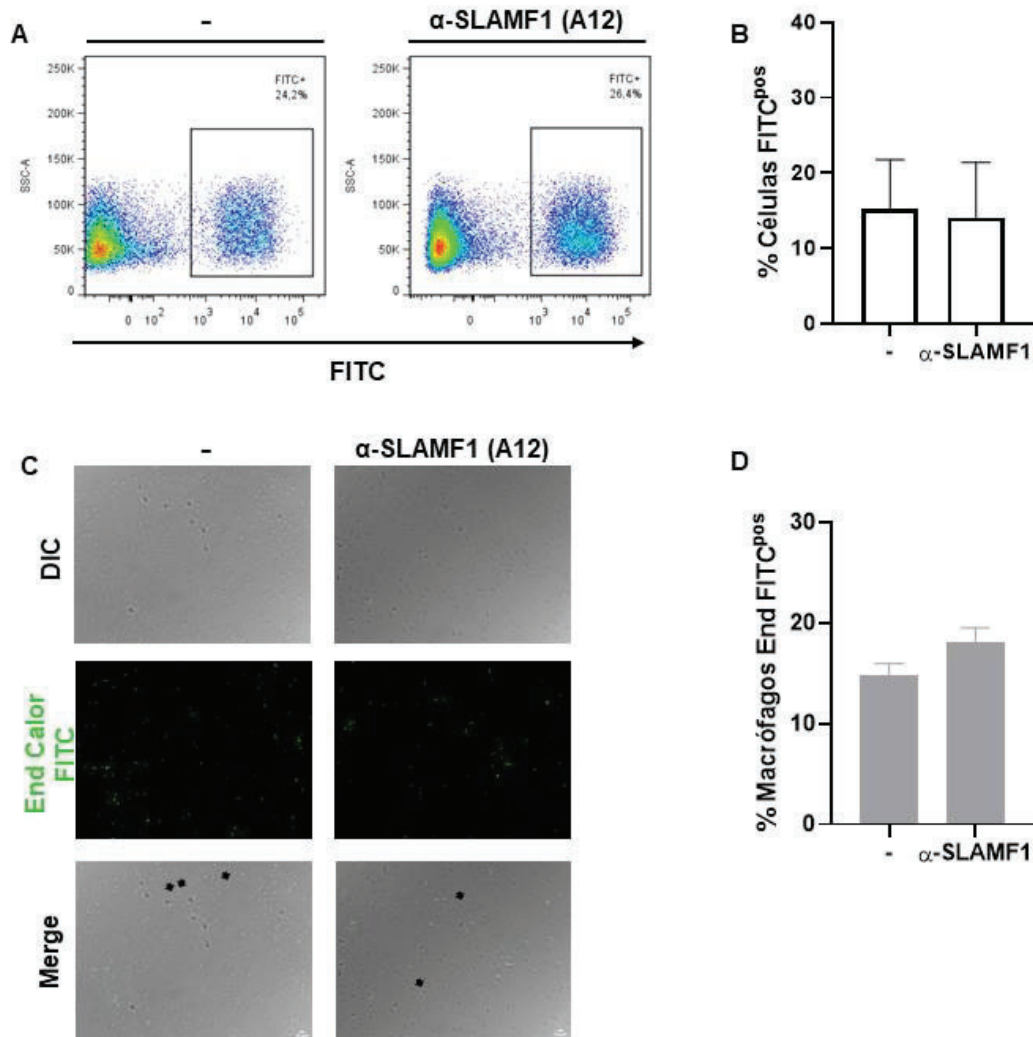
Estos resultados muestran que SLAMF1 tampoco interacciona con la cepa endógena de *C. difficile* aislada en nuestro laboratorio.

SLAMF1 no induce la interacción de la cepa endógena de *C. difficile* y los macrófagos humanos

Finalmente, evaluamos el rol de SLAMF1 sobre la modulación de la interacción entre macrófagos y la cepa endógena de *C. difficile*.

Macrófagos derivados de monocitos de donadores sanos fueron cultivados en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista para SLAMF1 (α -SLAMF1 (A12)) y estimulados con *C. difficile* endógena inactivada con calor acoplada a FITC (End Calor FITC) por 24 horas (Fig. 8A-D). El porcentaje de células interaccionando con *C. difficile* fue evaluado en primera instancia por citometría de flujo (Fig. 8A-B) y también por microscopia de fluorescencia (Fig. 8C-D). No observamos diferencias cuando la señalización de SLAMF1 fue activada con el anticuerpo agonista respecto de los macrófagos que no habían sido expuestos a α -SLAMF1 durante el cultivo (Fig. 8A-D). Es decir que los macrófagos derivados de monocitos humanos no modifican su capacidad de interaccionar con *C. difficile* endógena inactivada con calor cuando ocurren interacciones homofílicas SLAMF1-SLAMF1.

Al determinar la expresión de SLAMF1 en los macrófagos que estaban interactuando con *C. difficile*, observamos niveles muy bajos de esta molécula por citometría de flujo (Fig. 8E). La mayoría de los macrófagos SLAMF1 positivos no estaban interactuando con la bacteria y la mayoría de las células interactuando con *C. difficile* endógena no expresaron SLAMF1 (Fig. 8E). Similarmente a lo evidenciado por la cepa NAP-1/BI/027, relaciones crecientes de End Calor FITC indujeron un incremento en la capacidad de los macrófagos de interactuar con la bacteria (Fig. 8F).



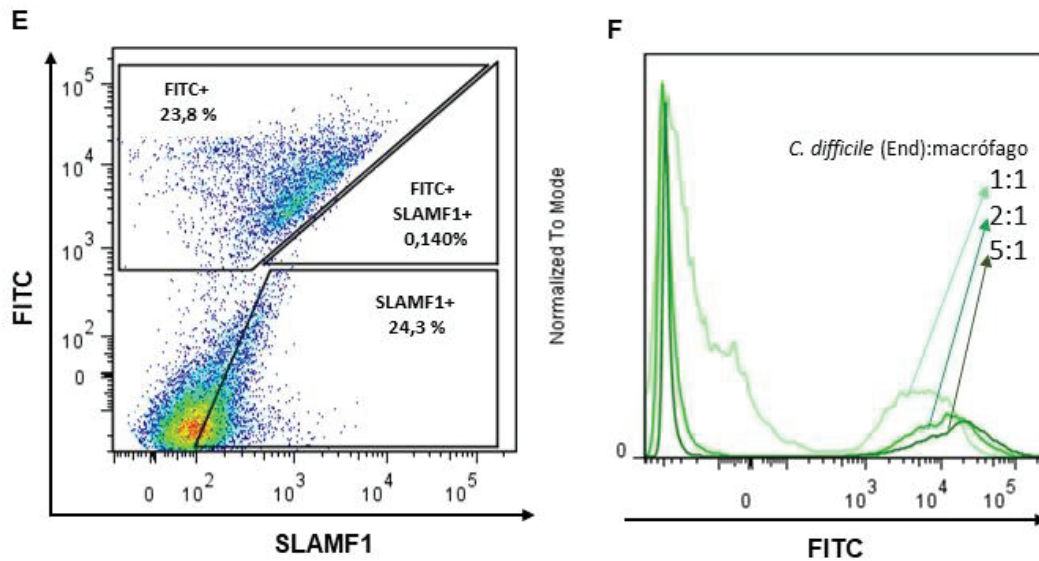


Fig. 8 Rol de SLAMF1 en la interacción macrófagos-*C. difficile* endógena. (A-D) Macrófagos de dadores sanos se estimularon con *C. difficile* inactivada con calor acoplada a FITC (CD Calor FITC) por 24 horas en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista α -SLAMF1. Se muestra un gráfico de puntos representativo de 3 experimentos independientes (A) y la cuantificación correspondiente a los porcentajes de células FITC positivas como medida de interacción entre los macrófagos y *C. difficile* en los gráficos de barras (B). (C) Micrografías representativas de 3 experimentos independientes tomadas con objetivo 20X y (D) porcentaje de células interactuando con *C. difficile* evaluado por microscopía de fluorescencia. (E) Grafico de puntos representativo del porcentaje de células positivas para FITC, positivas para SLAMF1 y dobles positivas. (F) Histograma representativo de macrófagos derivados de monocitos estimulados por 24 horas con cantidades crecientes de *C. difficile* endógena en relación a la cantidad de macrófagos, donde el porcentaje de células FITC positivas en la relación 1:1 corresponde al 23,15 %, en la relación 2:1 al 33,1 % y en la relación 5:1 al 46,6%.

Barras de escala: 10 μ m

B y D, Las barras representan la media \pm SEM. B, prueba de Wilcoxon. D, prueba de Mann-Withney.

C, Las flechas señalan *C. difficile* sin interactuar con macrófagos.

Finalmente estudiamos la localización celular de *C. difficile* endógena por microscopia de fluorescencia, utilizando CD14 como marcador de superficie y EEA1 y LAMP2 como marcadores endosomales tempranos y tardíos (Fig. 9). Pocas bacterias fueron detectadas en el espacio extracelular. En su mayoría se encontraron en células positivas para CD14 o LAMP2 (Fig. 9A). Al igual que lo mencionado para la cepa NAP1/BI/027, se requiere la evaluación de las células por microscopia confocal para confirmar la internalización de la bacteria. Sin embargo, estas observaciones nos permiten proponer que la cepa endógena de *C. difficile* también podría interactuar con los macrófagos humanos, siendo endocitada por algún mecanismo que no requiere la acción de SLAMF1. Confirmando los resultados obtenidos por citometría de flujo (Fig. 8E), observamos por microscopía que la mayoría de las células positivas para SLAMF1 no

contenían bacterias (Fig. 9B). Además, detectamos que *C. difficile* endógena también induce una mayor proporción de células que forman endosomas tardíos en comparación con endosomas tempranos a las 24 horas post estimulación (Fig. 9C-D).

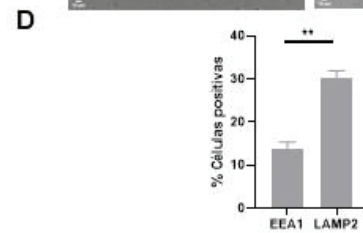
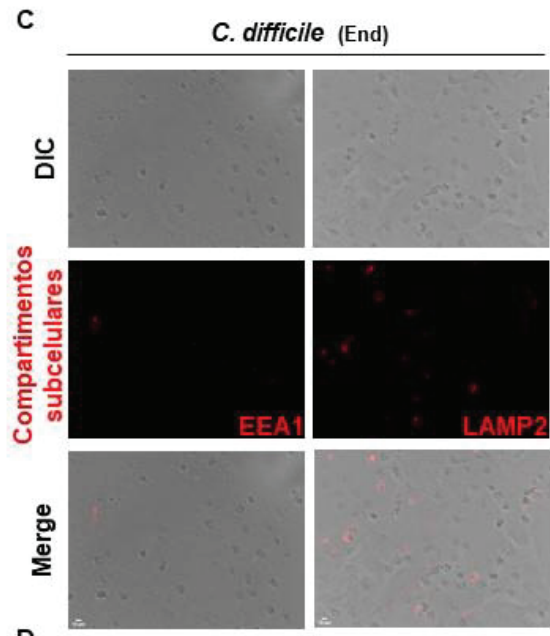
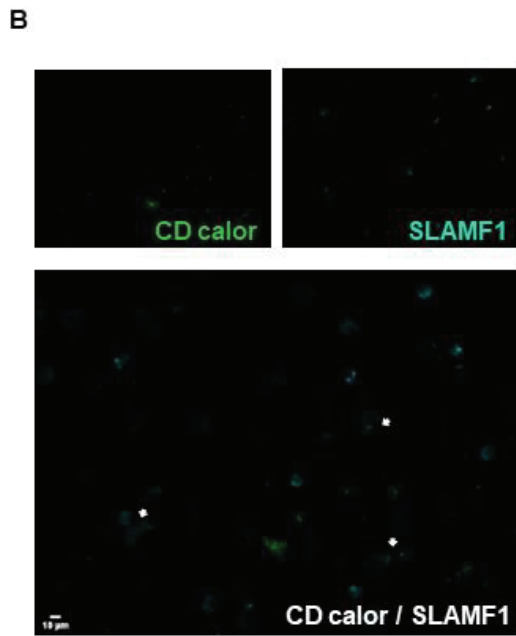
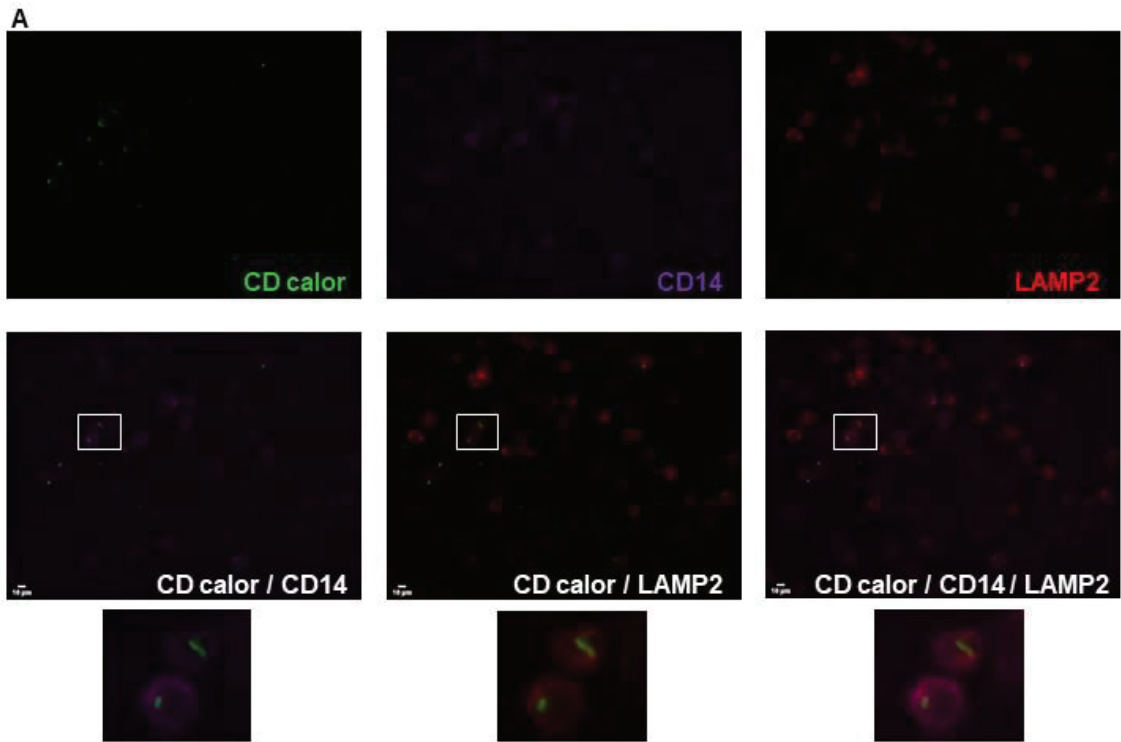


Fig. 9 Localización celular de la cepa endógena de *C. difficile*. (A-D) Macrófagos de dadores sanos se estimularon con *C. difficile* endógena inactivada con calor acoplada a FITC (End Calor FITC) por 24 horas. Se muestran micrografías tomadas con un objetivo 40X representativas de 3 experimentos independientes. Para la detección de CD14 (A), EEA1 (C), LAMP2 (A y C) y SLAMF1 (B) se utilizaron anticuerpos específicos de ratón anti-CD14, anti-EEA1, anti-LAMP2 o anti-SLAMF1 humano, seguido de anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a Alexa Fluor 647 (magenta para CD14, cian para SLAMF1) o Alexa Fluor 546 (rojo para EEA1 y LAMP2). La detección de las moléculas se realizó luego de la fijación y permeabilización de los macrófagos. DIC, contraste de interferencia diferencial. (D) Las barras representan la media \pm SEM del porcentaje de células positivas para EEA1 o LAMP2. Barras de escala: 10 μ m
B, Las flechas señalan *C. difficile* interaccionando con macrófagos SLAMF1 positivos
**, $p < 0.01$. D, prueba de Mann-Whitney

Estos resultados demuestran que, al igual que lo observado con la cepa NAP-1/BI/027, SLAMF1 no promueve la interacción entre macrófagos y la cepa endógena de *C. difficile* y no participaría en el proceso de internalización de la bacteria.

Las cepas NAP1/BI/027 y endógena de *C. difficile* inducen la expresión de SLAMF1 en células CD14 positivas de dadores sanos y pacientes con CDI

Los estudios en monocitos y macrófagos durante la infección por *C. difficile* (CDI) se han llevado a cabo mayormente en líneas celulares y modelos murinos. El conocimiento de las respuestas inducidas por estas células en pacientes con CDI permanece poco explorado. Es así que hemos comenzado con estudios preliminares en pacientes con CDI de centros de salud de nuestra región.

Hasta el momento contamos con muestras de un número reducido de pacientes de los que hemos evaluado la expresión de SLAMF1 y CD163 en primera instancia. Para esto, células mononucleares de sangre periférica (CMSP), tanto de los pacientes como de dadores sanos, fueron obtenidas y estimuladas por 24 horas con la cepa NAP1/BI/027 y endógena de *C. difficile*. Para el análisis de los datos las células CD14 positivas (monocitos) fueron seleccionadas como se muestra en la Fig. 10.

Al evaluar la expresión de SLAMF1 en la superficie de células CD14 positivas de dadores sanos luego de 24 horas de estímulo, observamos que la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* inactivada por calor (CD Calor) fue capaz de inducir significativamente los niveles de SLAMF1 (Fig. 11A-B). Si bien se observan resultados similares para la cepa de *C. difficile* endógena, el número de muestras analizadas (N=2) no permite realizar un análisis estadístico de los datos.

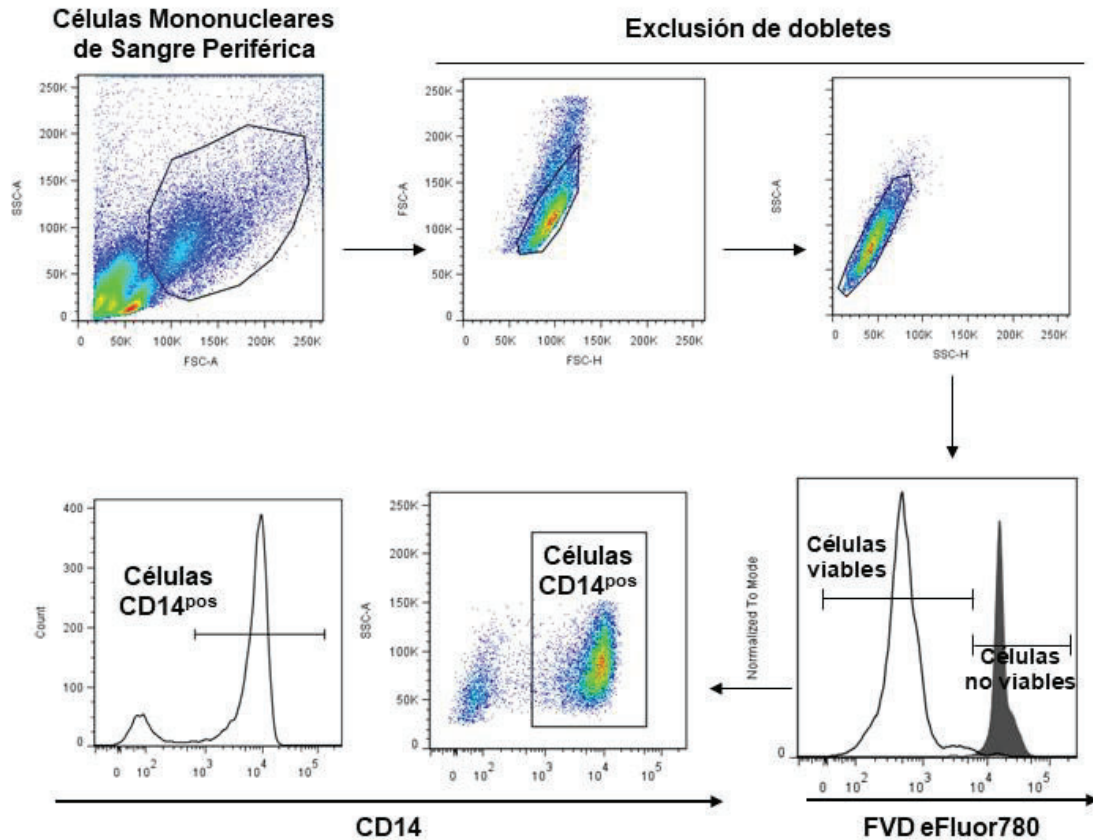


Fig. 10 Estrategia de selección para análisis de citometría de flujo. Después de seleccionar la población de interés (SSC-A vs. FSC-A), las células se seleccionaron para excluir los dobletes mediante una estrategia de doble singuletes (FSC-A vs. FSC-H y SSC-A vs. SSC-H). Posteriormente, las células vivas vs. muertas se determinaron empleando un colorante de viabilidad (FVD eFluor780) que marca irreversiblemente las células muertas. Se utilizaron células muertas por calor para los controles de compensación. Las células muertas se excluyeron del análisis y la expresión de CD14 se evaluó en células FVD eFluor780neg (células vivas).

En el caso de las CMSP de dadores sanos estimuladas con la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* también evaluamos la producción de TNF- α por citometría de flujo luego de 24 horas (**Fig. 11C-E**). CD Calor indujo la producción de TNF- α de manera significativa (**Fig. 11C**) como así también el porcentaje de células TNF- α positivas que expresaban también SLAMF1 (**Fig. 11D**). Más aun, al analizar las células productoras de TNF- α , observamos que luego de la estimulación con CD Calor, la mayoría de las células expresaron SLAMF1 en su superficie (**Fig. 11E**).

Finalmente estudiamos la expresión de CD163 y, aunque el número de muestras no permite realizar análisis estadísticos, los niveles de esta molécula en superficie fueron bajos 24 horas luego de la estimulación antigénica con CD Calor, CD Formol, End Calor y End Formol (menores al 2,5% en todos los casos) (**Fig. 11F**).

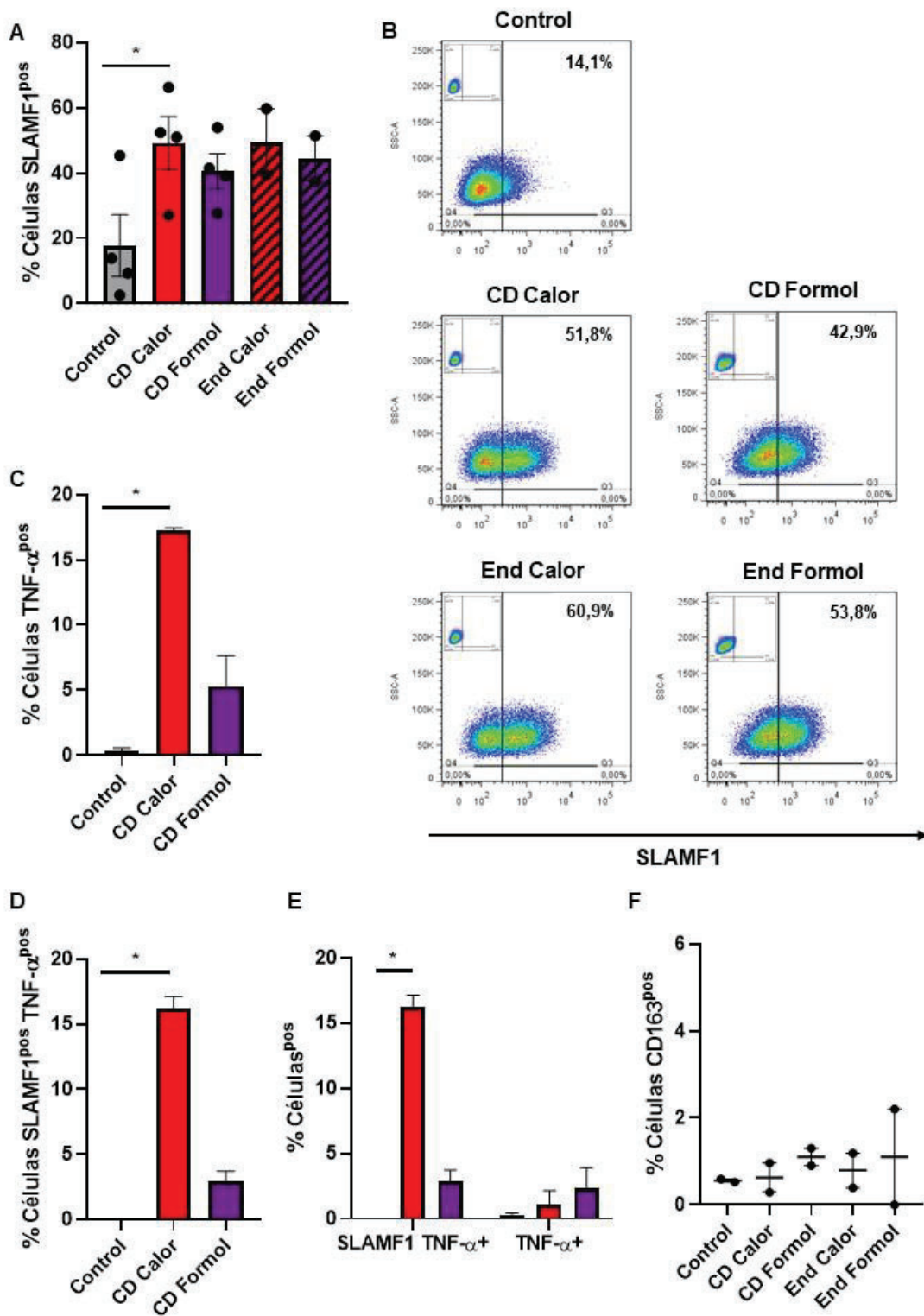


Fig. 11 Expresión de SLAMF1 en células CD14 positivas de dadores sanos. CMSP de dadores sanos fueron estimuladas en presencia/ausencia del *C. difficile* (NAP1/BI/027 o endógena) inactivada con calor (CD Calor o End Calor) o Formol (CD Formol o End Formol) por 24 horas. La expresión de SLAMF1 (A-B, D-E), TNF- α (C-E) y CD163 (F) en células CD14 positivas (monocitos) fue determinada por citometría de flujo. (A) Expresión de SLAMF1. (B) Gráfico de puntos representativo de células estimuladas con ambas cepas de *C. difficile*. (C) Producción de TNF- α . (D) Coexpresión de SLAMF1 y TNF- α . (E) Células positivas para SLAMF1 y TNF- α (SLAMF1⁺TNF- α ⁺) y células positivas sólo para TNF- α (SLAMF1⁻TNF- α ⁺) (F) Expresión de CD163.

Las barras representan la media \pm SEM *, P <0,05. A y C-E, Prueba de Friedman con prueba post hoc corregida de Dunn

Al estudiar las CMSP de los pacientes con CDI, observamos expresión de SLAMF1 luego de la estimulación con *C. difficile* en las células CD14 positivas, sin embargo, los niveles de SLAMF1 fueron diferentes en ambos pacientes (Fig. 12A). Las características más relevantes de los pacientes se muestran en la **tabla I**, pudiendo destacarse que uno de los pacientes adquirió la CDI en el centro de salud del que provenía la muestra (paciente CDI intrahospitalario) y el otro resultó ser un caso adquirido en la comunidad (paciente CDI de la comunidad). La diferencia en la expresión de SLAMF1 podría deberse a esta característica ya que ambos mostraron modulación de SLAMF1 frente al estímulo con *C. difficile*. Mientras que el paciente CDI intrahospitalario mostró los mayores niveles de SLAMF1 frente a CD Calor con un porcentaje de aproximadamente 18%, el paciente CDI de la comunidad mostró niveles superiores de SLAMF1 mayores al 53% en todas las condiciones de estímulo estudiadas (CD Calor, CD Formol, End Calor y End Formol). Por otro lado, la expresión de CD163 en el paciente CDI de la comunidad fue menor al 1% y no mostró modificaciones frente a *C. difficile* (Fig. 12B).

Estos resultados muestran que la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* regula positivamente la expresión de SLAMF1 y la producción de TNF- α mientras que parece no modular la expresión de CD163 en superficie de monocitos humanos provenientes de dadores sanos, lo que podría indicar la inducción de un perfil proinflamatorio. En los pacientes con CDI, la exposición de los monocitos a la bacteria induce los niveles de SLAMF1 y no modularía la expresión de CD163.

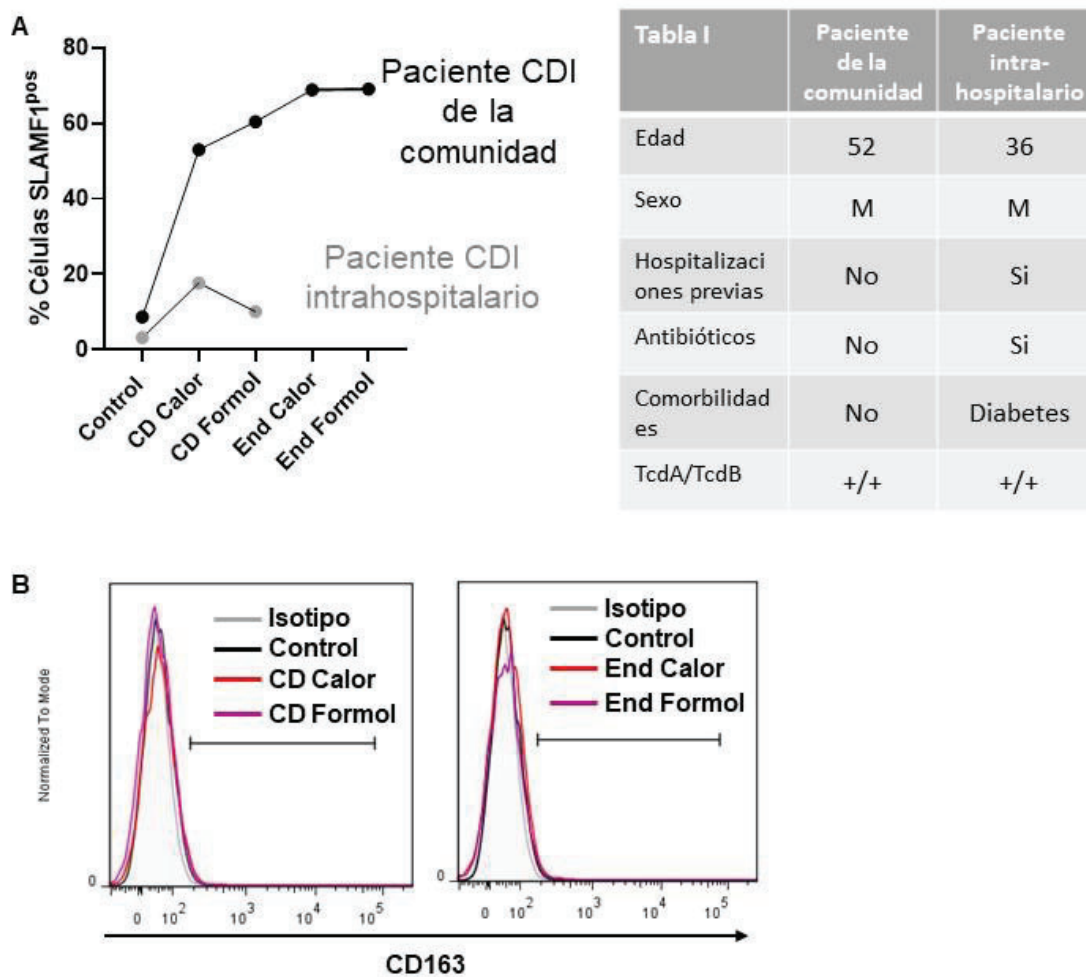


Fig. 12 Expresión de SLAMF1 en células CD14 positivas de pacientes con CDI. CMSP de dos pacientes con CDI fueron estimuladas en presencia/ausencia del *C. difficile* (NAP1/BI/027 o endógena) inactivada con calor (CD Calor o End Calor) o Formol (CD Formol o End Formol) por 24 horas. La expresión de SLAMF1 (A) y de CD163 (B) en células CD14 positivas (monocitos) fue determinada por citometría de flujo. (A) Expresión de SLAMF1. (B) Histograma correspondiente al paciente CDI de la comunidad estimulado con ambas cepas de *C. difficile*

Las cepas NAP1/BI/027 y endógena de *C. difficile* interactúan con células CD14 positivas de donadores sanos y pacientes con CDI

Por último, evaluamos la capacidad de los monocitos provenientes de donadores sanos y pacientes con CDI de interactuar con las cepas NAP1/BI/027 y endógena de *C. difficile*. Con este fin, las CMSP de los donadores sanos y del paciente CDI de la comunidad fueron incubadas por 24 horas con las cepas NAP1/BI/027 y endógena de *C. difficile* inactivadas por calor y acopladas a FITC (CD Calor FITC o End Calor FITC) para ser evaluadas por citometría de flujo.

Las células CD14 positivas (monocitos) de los donadores sanos mostraron una gran capacidad de interactuar con *C. difficile*, tanto con la cepa endógena como con la cepa hipervirulenta (Fig. 13A-

B), observándose aproximadamente un 80% de monocitos interactuando con la bacteria. Además, al evaluar la expresión de SLAMF1, detectamos que alrededor de un 45% de los monocitos que interactuaron con *C. difficile* expresaron SLAMF1 y que el 80% de las células SLAMF1 positivas estaban interactuando con ambas cepas bacterianas (Fig. 13C).

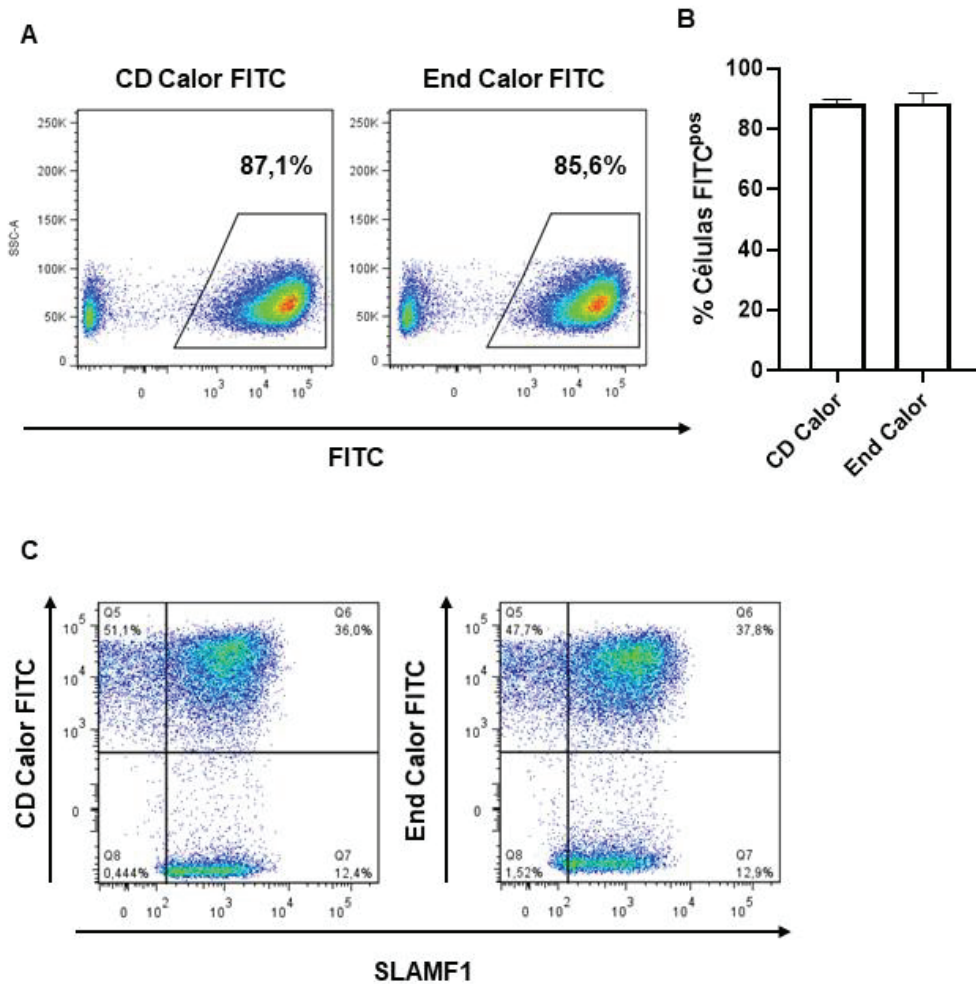


Fig. 13 Interacción de células CD14 positivas de dadores sanos con *C. difficile*. CMSP de dadores sanos fueron estimuladas en presencia/ausencia del *C. difficile* (NAP1/BI/027 o endógena) inactivada con calor y acoplada a FITC (CD Calor FITC o End Calor FITC) por 24 horas. **(A)** Gráfico de puntos representativo de 4 experimentos independientes que muestra el porcentaje de monocitos interactuando con la cepa NAP1/BI/027 o endógena de *C. difficile*. **(B)** Media \pm SEM del porcentaje de células interactuando con *C. difficile*. **(C)** Gráfico de puntos representativo de 4 experimentos independientes que muestra el porcentaje de células SLAMF1 positivas, FITC positivas (interaccionando con la bacteria) y dobles positivas.

B, Prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Al evaluar los monocitos del paciente CDI de la comunidad pudimos observar que también poseen una gran capacidad para interactuar con *C. difficile*, tanto con la cepa NAP1/BI/027 como con la cepa endógena (Fig. 14A). Al estudiar la expresión de SLAMF1, detectamos que más de la mitad de los monocitos que interactuaron con ambas cepas resultaron SLAMF1 positivos (Fig. 14B). Más aun, casi la totalidad de las células que expresaron SLAMF1 se encontraban interactuando con *C. difficile* (Fig. 14B)

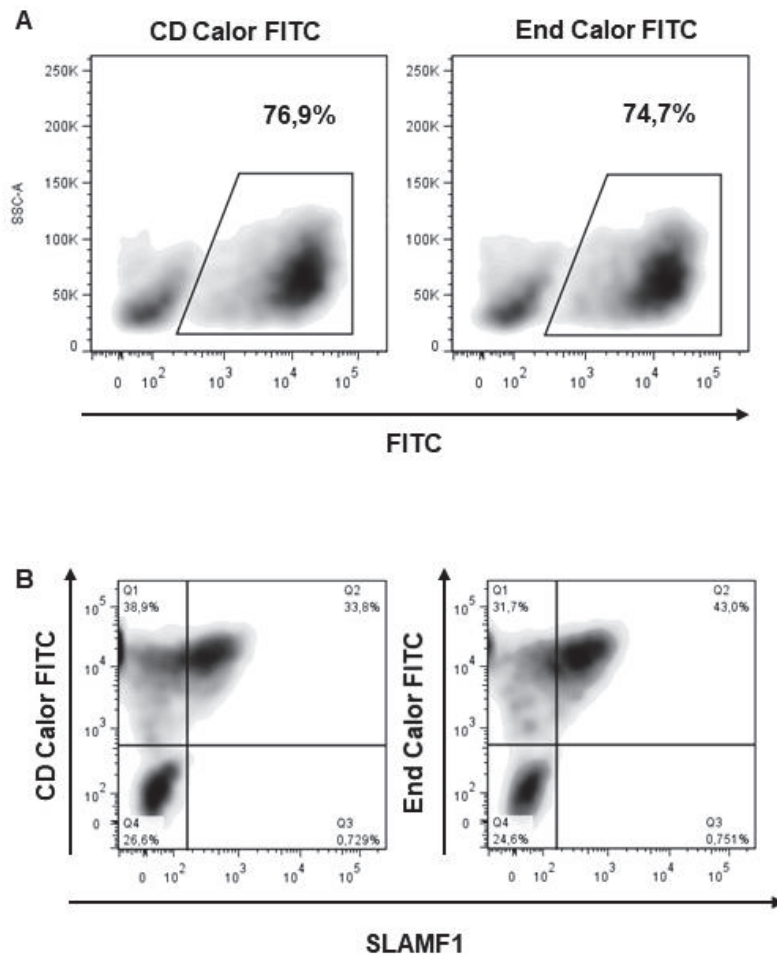


Fig. 14 Interacción de células CD14 positivas de un paciente con CDI con *C. difficile*. CMSP de un paciente con CDI adquirida en la comunidad fueron estimuladas en presencia/ausencia del *C. difficile* (NAP1/BI/027 o endógena) inactivada con calor y acoplada a FITC (CD Calor FITC o End Calor FITC) por 24 horas. **(A)** Gráfico de densidad que muestra el porcentaje de monocitos interactuando con la cepa NAP1/BI/027 o endógena de *C. difficile*. **(B)** Gráfico de densidad que muestra el porcentaje de células SLAMF1 positivas, FITC positivas (interaccionando con la bacteria) y dobles positivas.

Estos resultados, aunque preliminares, sugieren que los monocitos de dadores sanos y pacientes con CDI poseen gran capacidad de interactuar con la cepa hipervirulenta NAP1/BI/027 de *C.*

difficile y con la cepa endógena aislada en nuestro laboratorio. Además, un gran porcentaje de estas células expresan SLAMF1, lo que supone un rol de SLAMF1 en los monocitos frente a la CDI.

Tomados en conjunto, los resultados de este capítulo muestran que la expresión de SLAMF1 es modulada por *C. difficile* de manera diferencial en los monocitos y macrófagos. Mientras que en los macrófagos ni la cepa hipervirulenta NAP1/BI/027 ni la cepa endógena inducen la expresión de SLAMF1, en los monocitos hemos encontrado altos niveles de expresión en superficie. Además, los monocitos mostraron una capacidad superior de interactuar con *C. difficile* y la mayoría de los monocitos que interactuaron con la bacteria expresaban SLAMF1, a diferencia de los macrófagos que resultaron SLAMF1 negativos casi en su totalidad. Las interacciones homofílicas SLAMF1-SLAMF1 no indujeron la interacción entre los macrófagos y *C. difficile*. Por último, encontramos bacterias en macrófagos CD14 y LAMP2 positivos. Aunque todavía se requieren más estudios, estos resultados sugieren que SLAMF1 no actúa como sensor microbiológico de *C. difficile* en macrófagos pero que, si podría tener un potencial rol en monocitos y que, tanto la cepa hipervirulenta como la endógena, disparan respuestas similares en los monocitos y macrófagos humanos.

Discusión



Clostridioides difficile, un bacilo anaeróbico Gram positivo y formador de esporas, es la causa bacteriana más común de diarrea identificable en pacientes hospitalizados asociada al uso de antibióticos. Sin embargo, en los últimos años, la aparición de casos de origen comunitario ^{164,165} ha despertado la preocupación de especialistas de la medicina y la infectología a nivel mundial. Además, crecientes reportes muestran la presencia de *C. difficile* en animales domésticos, de granja e incluso osos polares, que pueden dar lugar a la enfermedad zoonótica y a nuevas rutas de contagio ^{165,166}. La transmisión de *C. difficile* ocurre típicamente por la vía fecal-oral, pero también puede tener lugar a partir de superficies, objetos u alimentos contaminados ¹⁵⁵; incluso el contagio vía secreciones naso-bucal ha sido recientemente sugerido ¹⁸⁶. Los cambios en la epidemiología de la infección por *C. difficile* (CDI) y la aparición de nuevas cepas hipervirulentas convierten a la CDI en un grave y emergente problema sanitario. Desde el inicio de la pandemia por COVID-19, se estima que aproximadamente el 72% de los pacientes de COVID-19 fueron tratados con antibióticos de amplio espectro para prevenir coinfecciones bacterianas, los que a su vez se asocian fuertemente a la CDI. Por lo tanto, se espera que el número de infecciones por *C. difficile*, en particular las recurrencias, aumente con el tiempo. Más aun, ambas infecciones presentan manifestaciones clínicas similares, lo que puede llevar a un diagnóstico ineficiente o erróneo provocando retrasos en el tratamiento adecuado y subestimación de los casos de CDI ²⁴⁰.

C. difficile puede colonizar e inducir enfermedad del colon que se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias en la mucosa. La colitis pseudomembranosa es una forma grave de la CDI, pero las manifestaciones clínicas son variadas, desde una enfermedad asintomática hasta sepsis, shock séptico y muerte. *C. difficile* secreta las toxinas A y B que han demostrado ser las principales responsables del daño en el intestino ¹⁷⁹. La mayoría de los estudios se centran en el rol de las toxinas utilizando incluso modelos de intoxicación y no de infección. Sin embargo, *C. difficile* posee otros componentes que podrían tener un papel importante en la inducción de respuestas inmunes, como las SLPs (proteínas de la capa superficial) que son antígenos inmunodominantes. En este trabajo de tesis doctoral exploramos el rol de monocitos y macrófagos humanos expuestos a dos cepas de *C. difficile* inactivadas por tratamiento físico con temperatura o químico con formol.

El microbioma tiene un papel muy importante en la salud humana. Los cambios en la composición de la microbiota pueden conferir resistencia o promover la infección por bacterias patógenas como *C. difficile*. Los antibióticos tienen un profundo impacto sobre la microbiota, alterando el estado de equilibrio y pudiendo conducir a la expansión de poblaciones patógenas, que

aprovechan nutrientes y señales del entorno para promover su propio crecimiento y virulencia. El sistema inmune y la microflora están en constante y estrecho contacto, regulándose mutuamente. La mucosa intestinal es un entorno particularmente dinámico en el que el hospedador interactúa constantemente con billones de microorganismos comensales e interactúa periódicamente con patógenos de diversa naturaleza. Además, tanto la microbiota intestinal como el sistema inmunológico están íntimamente relacionados con otros procesos fisiológicos como el metabolismo y los cambios epigenéticos ²⁴¹. La interacción entre el sistema inmunológico intestinal, la barrera epitelial y las bacterias que residen dentro, es fundamental para mantener una homeostasis saludable en el intestino y así, ante un proceso patológico, determinar la resolución hacia salud o enfermedad ¹⁹⁴. Comprender las interacciones entre la microbiota, las respuestas inmunes del hospedador y las bacterias patógenas permitirá establecer nuevas estrategias frente a enfermedades infecciosas, ya sea manipulando la microflora, el sistema inmune o las relaciones entre ellos.

Si bien existen diversos estudios acerca de la patogénesis de *C. difficile*, conocemos poco sobre la eliminación de este patógeno. Comprender cómo el sistema inmunológico elimina la infección causada por *C. difficile* podría ofrecer información importante para nuevas estrategias de tratamiento. Muchas cepas de la bacteria no se eliminan eficazmente del intestino y cuando esto ocurre, los pacientes pueden ser susceptibles a infecciones recurrentes o pueden desarrollar formas más graves de la enfermedad. Aún quedan importantes interrogantes en nuestra comprensión sobre los procesos inmunes y las células inmunológicas que intervienen durante el curso de la CDI. Con este trabajo pretendemos lograr un mayor grado de conocimiento de las funciones de los macrófagos y el rol de la Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAMF1) en las respuestas frente a *C. difficile*.

La mucosa intestinal tiene la particularidad de recibir continuamente monocitos de circulación que arriban para mantener la población de macrófagos residentes intestinales ²⁴². El reclutamiento de monocitos se asocia a menudo con el desarrollo de inflamación y daño epitelial en las mucosas. Las células derivadas de monocitos son mediadores claves durante las respuestas inflamatorias en el tracto gastrointestinal. Los macrófagos intestinales son esenciales para la homeostasis local y para mantener el equilibrio entre la microbiota comensal y el hospedador. Sin embargo, también juegan un papel esencial en la inflamación e inmunidad protectora frente a microorganismos patogénicos.

Varios reportes describen el rol de las toxinas o de las SLPs de *C. difficile* en las respuestas macrofágicas. Claude Siffert y col. mostraron que la toxina B no afecta la viabilidad de los fagocitos

mononucleares humanos ni ejerce un efecto lítico significativo ²⁴³. En cambio, si puede alterar la morfología de los monocitos y más pronunciadamente de los macrófagos. También afecta la función fagocítica de estos últimos ya que se observó un menor porcentaje de macrófagos capaces de fagocitar levaduras, así como también una reducción en la cantidad de levaduras fagocitadas cuando habían sido tratados con la toxina B de la cepa 79685 (altamente toxigénica) de *C. difficile* durante toda una noche ²⁴³. También se ha propuesto que la IL-8 liberada por macrófagos expuestos a las toxinas de *C. difficile* en la lámina propia podría crear un gradiente quimiotáctico induciendo la migración de neutrófilos al sitio de infección en la mucosa provocando la inflamación típicamente observada durante la colitis ²²⁴. Por otro lado, ha sido observado que la toxina A de la cepa VPI 10463 de *C. difficile* induce la pérdida de viabilidad de células aisladas de lámina propia humana, con una pérdida temprana de macrófagos CD68+ (dentro de las 72 horas), lo cual podría inhibir el sistema inmune de la mucosa colónica *in vivo* y provocar una forma grave de la enfermedad ²²⁷. Es importante tener en cuenta que las muestras de tejido intestinal fueron obtenidas de pacientes con carcinoma. En línea con estos resultados, un trabajo más reciente muestra que la toxina A de la cepa VPI 10463 de *C. difficile* induce una rápida pérdida (dentro de las 24 horas) de monocitos provenientes de sangre periférica y células THP-1 por procesos apoptóticos y necróticos ²²⁶.

El rol del inflammasoma en los macrófagos ha sido caracterizado durante la CDI. Las toxinas A y B de la cepa hipervirulenta NAP1/027 de *C. difficile* desencadenan la liberación de IL-1 β mediante la activación de la proteína adaptadora del inflammasoma ASC, una respuesta que contribuye a la inflamación y daño generados por las toxinas *in vivo* ²⁴⁴. Estos estudios fueron realizados utilizando la línea celular macrofágica THP-1 diferenciadas con PMA y con ratones deficientes para diferentes componentes del inflammasoma, pero sin generar un modelo *in vivo* de infección, sino inyectando las toxinas luego de realizar cirugía del íleon. Reportes posteriores confirman el rol de inflammasoma en la CDI. Macrófagos murinos peritoneales infectados *in vitro* con *C. difficile* viva o muerta por calor inducen pro-IL-1 β , pero solo la bacteria viva puede activar el inflammasoma y la producción de IL-1 β madura ²³⁰. Esta inducción es más eficiente en las cepas toxigénicas (VPI 10463 y NAP1/BI/027) que en las no toxigénicas ²³⁰. Los autores también muestran que la producción de pro-IL-1 β inducida por *C. difficile* es completamente dependiente de MyD88 y parcialmente dependiente de TLR2 y proponen que las células sufren piroptosis liberando SLPs al medio extracelular ²³⁰. Además, obtuvieron el colon de ratones infectados *in vivo* luego de 2 días y encontraron producción de IL-1 β y activación de caspasa 1, indicando activación del inflammasoma. Por último, aunque los estudios realizados en el trabajo no lo demuestran

directamente, los autores proponen que la fagocitosis de la bacteria o de sus toxinas debe ocurrir para disparar estos mecanismos ²³⁰.

Las SLPs de *C. difficile* aislada de un paciente (HPA UK ref. R13537, cepa frecuentemente encontrada en pacientes) inducen la secreción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p40, MIP-1a, MIP-2 y MCP), regulan positivamente la expresión de marcadores de activación de superficie (TLR2, TLR4, CD14, CD40, CD80 y CMH II) favorecen la migración en respuesta a IL-2 y GM-CSF e inducen la fagocitosis de micropartículas de látex en la línea celular macrofágica murina J774A.1 ²⁴⁵. Más aun, fue observado que varias de estas funciones están reguladas por una vía de señalización que involucra a p38 ²⁴⁵. El rol de las SLPs así como también el rol de las proteínas de shock térmico HSP42 y HSP60 y los flagelos obtenidos de 5 cepas diferentes de *C. difficile* (el ribotipo hipervirulento 027, ribotipos 001 y 106 y las cepas de referencia VPI 10463 y 630) ha sido abordado en la línea celular humana THP-1 activada con PMA. Todos los estímulos derivaron en una respuesta proinflamatoria caracterizada por la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12p70 ¹⁷⁸. En algunos casos se observó una relación negativa dosis-respuesta sugiriendo, por un lado, que pequeñas cantidades de antígenos de *C. difficile* podrían disparar respuestas inmunes y, por otro lado, que cantidades altas de ciertos estímulos podrían resultar citotóxicas ¹⁷⁸.

La mayoría de los estudios se han enfocado en comprender el rol de las cepas toxigénicas y las toxinas de *C. difficile* en la respuesta inmune innata considerando que los componentes toxigénicos son los mayores responsables del daño histopatológico observado durante la CDI. Más aún como se describe en los párrafos anteriores, la mayoría de los estudios se centran en la caracterización de la respuesta pro-inflamatoria por parte de los macrófagos; mientras que la función fagocítica y microbicida ha sido pobremente explorada. Los objetivos de este trabajo de tesis doctoral se centran en evaluar las respuestas macrofágicas frente a *C. difficile* inactivada por calor y formol, sin aislar individualmente componentes bacterianos para los ensayos *in vitro*.

Como fue mencionado previamente, SLAMF1 se expresa y modula funciones en macrófagos ^{59,67,69} y su expresión en contextos inflamatorios crónicos no es siempre constante ⁸⁰. En el contexto intestinal, se han detectado numerosos monocitos y macrófagos SLAMF1⁺ en el intestino inflamado de pacientes con enfermedad de Crohn ⁸⁰. Se ha demostrado también que SLAMF1 contribuye al desarrollo de colitis en ratones y parece regular indirectamente el reclutamiento de monocitos y macrófagos en tejidos intestinales inflamados ¹³⁹. Si bien el rol de SLAMF1 en las funciones macrofágicas ha sido abordado previamente, la mayoría de los trabajos han evaluado infecciones causadas por bacterias Gram negativas en modelos murinos ^{67,73,104};

solamente Berger y col. han estudiado el rol de SLAMF1 como sensor microbiológico de *S. aureus*⁶⁷. Los autores observaron que las funciones fagosomales no fueron moduladas por SLAMF1 en células que contenían esta bacteria⁶⁷. Sin embargo, la expresión de SLAMF1 en la superficie celular de monocitos mostró un aumento cuando estas células fueron estimuladas con antígenos de *S. aureus*⁷⁹ y, la inducción de SLAMF1, fue dependiente de la MAPK p38⁷⁹.

Hasta este momento, la función de SLAMF1 frente a *C. difficile* en las respuestas macrofágicas y monocíticas no había sido evaluada. En este trabajo de tesis doctoral hemos comenzado con la caracterización de esta molécula en respuesta a diferentes cepas de *C. difficile* en macrófagos y monocitos humanos. Nuestros resultados han mostrado que la estimulación de macrófagos derivados de monocitos de dadores sanos con *C. difficile* no modula la expresión de SLAMF1 en la superficie celular. La cepa hipervirulenta NAP-1/BI/O27 *C. difficile* inactivada por tratamiento con calor o formol no fue capaz de inducir los niveles de SLAMF1, incluso en las cantidades más elevadas utilizadas de la bacteria (relación *C. difficile*:macrófagos 5:1).

En este trabajo también utilizamos como estímulo una cepa endógena de *C. difficile* (End) aislada de nuestros animales de laboratorio luego de generada la disbiosis intestinal con un coctel de antibióticos típicamente utilizado en modelos murinos de CDI. Algunos estudios han propuesto que la pre-colonización con cepas no toxigénicas o menos virulentas de *C. difficile* protege frente a la infección con *C. difficile* patogénica^{246,247}. Los primeros reportes en la década de 1980 han demostrado que ratones y hámsteres colonizados por cepas no toxigénicas de *C. difficile* mostraron una mayor resistencia y una mayor sobrevivencia cuando fueron desafiados con *C. difficile* toxigénica²⁴⁸⁻²⁵⁰ e incluso hipervirulenta²⁵¹. Particularmente, Borriello y Barclay demostraron que este efecto era específico para *C. difficile* y que la protección era conferida por bacterias vivas (*C. difficile* muerta por calor no inducía protección)²⁴⁹. Interesantemente, en un ensayo clínico se observó que el pretratamiento con *C. difficile* no toxigénica fue seguro y eficaz para prevenir la CDI en pacientes durante el primer episodio o la primera recurrencia de CDI²⁵². Por otro lado, también se han caracterizado cepas endógenas productoras de toxinas que pueden conferir protección frente a episodios de CDI. Etienne-Mesmin y col. identificaron en sus ratones una cepa de *C. difficile*, LEM1, que compartía el 95% del genoma con la cepa VPI 10463 (toxigénica, no hipervirulenta), incluidos los genes de virulencia. Estos ratones habían sido testeados para la presencia de *C. difficile* previo a la realización de los experimentos y habían resultado negativos. Pero luego del tratamiento con antibióticos, previo a la infección, los ratones mostraban presencia de la bacteria. La administración de LEM1 antes o poco después de la inoculación con la cepa VPI 10463 evitó la muerte inducida en ratones por *C. difficile*²³⁹. Se ha propuesto que las

cepas no toxigénicas utilizadas para la pre-colonización o las cepas de *C. difficile* endógenas competirían por nutrientes específicos o nichos ecológicos con las cepas de *C. difficile* mas patogénicas. Recientemente ha sido demostrado que la reducción del aminoácido glicina en el intestino por parte de una cepa menos virulenta de *C. difficile* (630) es suficiente para disminuir la germinación y limitar la colonización de una segunda cepa altamente virulenta (VPI 10463). Los autores proponen que la inmunidad adaptativa no sería la responsable de mediar protección ya que ratones deficientes para Rag (carentes de respuesta T y B) no presentaron cambios en el score histopatológico del colon ²⁵³.

Sin embargo, no se ha demostrado si las cepas que confieren protección pueden modular directamente la respuesta inmune induciendo mecanismos responsables de los efectos protectivos. La cepa endógena de *C. difficile* aislada en nuestro laboratorio, que fue utilizada en este capítulo, está siendo actualmente secuenciada y comparada con la cepa NAP1/BI/027. La cepa endógena ha demostrado ser productora de toxinas mediante la prueba rápida TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®. Este enzimoimmunoensayo detecta simultáneamente el antígeno glutamato deshidrogenasa de *C. difficile* (una enzima muy conservada en la especie, tanto en las cepas toxigénicas como en las no toxigénicas; codificada en el gen *gluD*, el cual se encuentra fuera del PaLoc ²⁵⁴) y las toxinas A y B (en un mismo pocillo de reacción) a partir de muestras de materia fecal. También mostró las características típicas de las colonias de *C. difficile* (colonias de color gris-blanco con un aspecto de vidrio molido y un borde ligeramente filamentoso, con olor característico “similar al establo”, causado por la acumulación de p-cresol) y la capacidad de fluorescer ante luz UV en placas de CHROMagar *C. difficile*™. Con el fin de determinar si esta cepa impacta de manera diferencial en los macrófagos y monocitos, decidimos incluirla en nuestros estudios. Observamos que *C. difficile* endógena inactivada por calor y formol en todas las relaciones utilizadas no fue capaz de inducir la expresión de SLAMF1 en macrófagos a las 24 horas, comportándose, en este sentido, como la cepa NAP1/BI/027 patogénica.

Además de la expresión de SLAMF1 en la superficie de los macrófagos, evaluamos los niveles proteicos de CD163 por citometría de flujo. El receptor transmembrana scavenger CD163 ha sido ampliamente asociado a perfiles antiinflamatorios de macrófagos y, además, es un receptor específico del linaje monocítico-macrofágico conservado entre macrófagos humanos y murinos ²³⁶. Está involucrado en el clearance de los complejos hemoglobina-haptoglobina y en la regulación de los procesos inflamatorios ²³⁶. La activación tanto de los monocitos como de los macrófagos tisulares conduce a la liberación de CD163 como un factor soluble (sCD163); por lo tanto, sCD163 ha sido utilizado como un marcador específico de activación de monocitos y

macrófagos en circulación ²³⁶. Se ha reportado una relación inversa entre la expresión de CD163 en la superficie de monocitos humanos y los niveles de sCD163 en sangre humana, sugiriendo que sCD163 en plasma deriva de los monocitos circulantes. Además, este equilibrio estaría impulsado por el estado funcional de los monocitos y no por cambios numéricos en las células circulantes ²⁵⁵. La mayoría de los macrófagos residentes del colon del ratón en estado de reposo expresan niveles altos de CX3CR1 y CMH II, son ávidamente fagocíticos, pero son resistentes a la estimulación de los TLRs, producen IL-10 constitutivamente y expresan CD163 y CD206. La mayoría de los monocitos y macrófagos humanos de la mucosa ileal expresan bajos niveles de CD14, consistente con el fenotipo de macrófagos residentes, y también expresan CMH II, CD209 y / o CD163 ²⁵⁶. En la enfermedad de Crohn e IBD ha sido descrito un aumento de la expresión de CD163 en los macrófagos de la mucosa colónica inflamada y de sCD163 ²³⁶⁻²³⁸. Particularmente, un estudio propone que los macrófagos CD163⁺, al encontrarse abundantemente en las áreas inflamadas del intestino de los pacientes, podrían participar en la amplificación y perpetuación de la inflamación de la mucosa en curso de la IBD ²³⁸.

En nuestro trabajo, los niveles de CD163 estudiados por citometría de flujo fueron muy bajos en macrófagos derivados de monocitos de dadores sanos estimulados con *C. difficile*. El estímulo *in vitro* con CD Calor y CD Formol, aun en cantidades crecientes de bacteria en relación a la cantidad de macrófagos, no indujo aumentos en la expresión de CD163 en la membrana celular. Por lo tanto, los monocitos que podrían migrar desde la periferia hacia la mucosa intestinal y diferenciarse a macrófagos durante la CDI no presentarían este marcador característico de un fenotipo alternativo. Cuando estimulamos las células con *C. difficile* endógena tampoco observamos diferencias en la expresión de CD163 y el porcentaje de macrófagos que expresaron este receptor también fue muy bajo. Es decir que si *C. difficile* endógena produce una respuesta diferencial en los macrófagos no sería a través de la regulación de esta molécula. Sería interesante evaluar la presencia de macrófagos CD163⁺ en la mucosa intestinal en el modelo *in vivo* murino que contamos en nuestro laboratorio, así como también su localización específica y su asociación a la histopatología observada. También abordar los niveles de sCD163 en los pacientes con CDI como marcador de activación del linaje monocítico/macrofágico en esta infección. Teniendo en cuenta nuestros resultados y los reportes previos en otros contextos inflamatorios intestinales, es posible que CD163 pueda tener un papel dual en el control de las respuestas inmunes, dependiendo del microambiente en el que se encuentran las células, de la localización tisular y de la etiología del proceso inflamatorio.

Al estudiar la interacción de SLAMF1 con *C. difficile* mediante enfoques bioquímicos observamos tanto por citometría de flujo como por microscopía de fluorescencia que SLAMF1 no es capaz de reconocer a *C. difficile* en los macrófagos. La cepa NAP1/BI/027 *C. difficile* inactivada por calor o formol y la cepa endógena inactivada por calor no mostraron interacción directa con SLAMF1. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con lo observado previamente por Berger y col.⁶⁷. Si bien se ha demostrado que SLAMF1 puede sensar diferentes microorganismos, que incluyen virus^{70,71}, parásitos⁶⁹ y bacterias Gram negativas^{67,72,73}, no se ha encontrado interacción con bacterias Gram positivas. Incluso otro miembro de la familia de SLAM, SLAMF6, también puede reconocer bacterias Gram negativas⁷² y se ha propuesto que los aminoácidos en el ectodominio de SLAMF1 y SLAMF6 que interactúan con estructuras en la pared celular externa de las bacterias Gram negativas son diferentes de los residuos amoniocídicos necesarios para la formación de los homodímeros SLAM-SLAM⁷². Por lo tanto, de acuerdo a lo reportado anteriormente y a diferencia de lo encontrado en el primer capítulo con *M. tuberculosis*, SLAMF1 no reconoce directamente a *C. difficile*, reforzando estudios previos que demuestran que SLAMF1 no reconocería bacterias Gram positivas.

En este capítulo también expandimos los estudios de SLAMF1 como molécula coestimuladora capaz de modular la interacción entre los macrófagos y bacterias que encontramos en el primer capítulo de esta tesis. A diferencia de lo observado con *M. tuberculosis*, pero en concordancia con Wang y col. y Berger y col. que no encontraron diferencias mediadas por SLAMF1 en la fagocitosis de *E. coli*⁶⁶ y *S. aureus*⁶⁷ respectivamente, la interacción macrófagos-*C. difficile* no se vio afectada por SLAMF1. Utilizando un anticuerpo agonista de SLAMF1 para simular las interacciones homofílicas de este receptor, evaluamos por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia la interacción de los macrófagos con las cepas NAP1/BI/027 y endógena de *C. difficile*. La presencia del anticuerpo en el cultivo celular no modificó el porcentaje de macrófagos que fueron capaces de interactuar con las cepas de *C. difficile* inactivadas por calor. Más aun, un número muy bajo de células SLAMF1 positivas interactuaron con *C. difficile*, observado tanto por citometría de flujo como por microscopía de fluorescencia. Por otro lado, detectamos mayor interacción *C. difficile*-macrófagos al utilizar mayores cantidades de bacteria. Por lo tanto, SLAMF1 no tendría un rol coestimulador sobre la capacidad de los macrófagos de interactuar con *C. difficile* en la CDI.

Como fue mencionado, algunos autores han propuesto que *C. difficile* o sus componentes deben ser endocitados para disparar ciertos mecanismos que requieren el reconocimiento intracelular de la bacteria²³⁰. En este sentido, Solomon y col. demostraron que la toxina A es capaz de unirse

a los monocitos en mayor medida que a los linfocitos mediante citometría de flujo, luego de incubar las células con la toxina por 30 minutos a 4°C ²²⁶. En un estudio posterior demostraron que la toxina A interacciona con los monocitos y es internalizada, con una muerte subsecuente de estas células ²³². También interacciona con neutrófilos pero permanece en la superficie de los mismos y se asocia muy débilmente a linfocitos obtenidos de dadores sanos ²³². Esto sugiere que, en el contexto fisiológico de la CDI, las células que migren al sitio de infección podrían estar interactuando de manera diferencial con las toxinas y otras moléculas bacterianas.

Se ha demostrado además que la línea celular macrofágica murina Raw 264.7 puede unirse y fagocitar esporas de *C. difficile*, evitando que éstas germinen al mantenerlas aisladas de mediadores que favorecen el proceso germinativo (como taurocolato, glicina y otros aminoácidos) ²³¹. Como mencionamos previamente, *C. difficile* sufre esporulación y libera las esporas en el ambiente colónico. Las elevadas tasas de recurrencia de la CDI sugieren que las esporas de *C. difficile* pueden persistir en el colon del hospedador. En este trabajo observaron que, si bien los macrófagos murinos son capaces de fagocitar las esporas, éstas permanecen dormidas pero vivas y pueden generar toxicidad celular ²⁵⁷. Recientemente ha sido demostrado que tanto la toxina A completa como fragmentos de la misma provenientes de la cepa VPI 10463 de *C. difficile* remodelan las membranas, permitiendo su acceso a los endosomas y que los fragmentos de TcdA se unen al ADN y lo organizan para activar a TLR9 en la línea celular de epitelio colónico HT29 ²³³. Sin embargo, la localización endosomal de la toxina no fue demostrada.

Estos antecedentes muestran la interacción e internalización de las toxinas y esporas de *C. difficile*, sin embargo, la endocitosis de la bacteria no ha sido demostrada ni abordada previamente. Más aun, los receptores de superficie específicos que intervendrían en el reconocimiento de *C. difficile* o sus componentes no han sido descritos. Con el objetivo de estudiar la endocitosis de *C. difficile* y comprender su localización celular, estimulamos macrófagos derivados de monocitos con *C. difficile* (NAP1/BI/027 y endógena) acoplada a FITC y, conjuntamente, detectamos distintas moléculas de superficie y endosomales mediante microscopia de fluorescencia. Observamos que las bacterias estaban presentes conjuntamente tanto con CD14, marcador de superficie celular, como con LAMP2, marcador de endosoma tardío o lisosoma. Aunque requerimos de otras herramientas de la microscopia como la confocalidad, la evaluación de ejes ortogonales o la composición de Z-stacks para confirmar la internalización de la bacteria (o sus partes), estos resultados sugieren que ambas cepas de *C. difficile* podrían ingresar al interior celular de los macrófagos. Además, la exposición de los macrófagos a *C. difficile* indujo una mayor expresión de LAMP2 en el interior de las células en comparación a la expresión de EEA1 (endosoma temprano). Este resultado podría implicar la formación de endosomas

tardíos que se fusionarían con lisosomas para poder degradar el material endocitado, pero también podría indicar la presencia de autofagia. LAMP2 posee funciones alternativas, y es un regulador de la maduración tanto del fagosoma como del autofagosomas ²⁵⁸. Varios estudios recientes muestran que los procesos madurativos de estos compartimentos están conectados ²⁵⁸. La autofagia puede tener un rol beneficioso contribuyendo a la eliminación de patógenos mediante la inducción de la maduración del fagosoma o puede permitir el establecimiento de una infección persistente en macrófagos al secuestrar en los autofagosomas a los fagosomas que contienen bacterias ²⁵⁸. El primer caso ocurre típicamente frente a *M. tuberculosis* mediante el reclutamiento de la proteína autofágica LC3 hacia los fagosomas promoviendo su maduración ²⁵⁸. Un ejemplo del segundo caso lo constituye *Lesiteria monocytogenes*, una bacteria Gram positiva ²⁵⁸. Por lo tanto, resultaría útil estudiar la expresión de proteínas relacionadas a la autofagia como ATG5 o LC3 en macrófagos estimulados con *C. difficile*, así como también trabajar con diferentes tiempos de estimulación. La comprensión de las interacciones patógeno-hospedador implicadas en la patogénesis proporciona conocimientos mecánicos sobre los procesos celulares básicos y puede conducir al descubrimiento de nuevas terapias dirigidas a enfermedades infecciosas e inflamatorias. De esta manera se podría abordar el rol de la endocitosis y de la autofagia durante la CDI con el fin de comprender el tráfico de *C. difficile* en los macrófagos y sus posibles estrategias de escape y crecimiento intracelular.

Hemos visto que la expresión de SLAMF1 no se induce en la superficie de los macrófagos luego de la exposición a distintas cantidades de *C. difficile* y SLAMF1 tampoco es capaz de interactuar con la bacteria ni de modular la interacción de los macrófagos con *C. difficile*. Sin embargo, estos resultados no indican que SLAMF1 no posee ningún rol durante la CDI. SLAMF1 podría regular otros mecanismos como la secreción de citoquinas y quemoquinas, la migración de otras células inmunes, el mantenimiento de los macrófagos en el sitio de infección o el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. De hecho, ha sido propuesto que SLAMF1 podría regular la homeostasis de los macrófagos durante la enterocolitis crónica o aguda: SLAMF1 podría controlar la producción, proliferación y / o supervivencia de macrófagos CD11b⁺, o la expresión de SLAMF1 podría ser un requisito para la migración o retención de los macrófagos en los tejidos intestinales inflamados ¹³⁹. En otro estudio del mismo grupo de investigación, Wang y col. concluyeron que SLAMF1 y SLAMF8 (BLAME o CD353) gobiernan las respuestas inmunes innatas dependientes de ROS en las células mieloides, modulando la migración de estas células durante procesos inflamatorios de manera opuesta en modelos murinos de peritonitis ¹⁰⁴. Mientras SLAMF1 induce la migración de CDs y macrófagos F4/80⁺ al peritoneo, SLAMF8 regula la migración negativamente. Los autores proponen una regulación cruzada entre estos dos miembros de la

familia de SLAM: en los fagocitos migratorios, SLAMF1 actúa de manera temprana, mejorando las señales de migración mediadas por ROS. Posteriormente, SLAMF8 reduce las señales migratorias mediadas por ROS. Las señales inflamatorias inducen la actividad de SLAMF1, lo cual promueve la producción de ROS mediada por la NADPH oxidasa (NOX-2). Los mediadores inflamatorios (como el IFN- γ), aumentan posteriormente la expresión y función de SLAMF8. Esto lleva a la supresión de la producción de ROS que da como resultado la reducción de la infiltración de fagocitos. Por lo tanto, SLAMF1 y SLAMF8 en conjunto equilibran el grado de infiltración de células inflamatorias ¹⁰⁴.

Por otro lado, en este trabajo también hemos comenzado con la caracterización de la expresión de SLAMF1 y la función de los monocitos durante la CDI. Para esto analizamos células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos y pacientes con CDI estimuladas con *C. difficile* luego de 24 horas.

Una característica típica del proceso inflamatorio temprano en el colon está dada por un mayor reclutamiento de monocitos, que están sesgados para convertirse en fagocitos mononucleares inflamatorios preferentemente, en lugar de macrófagos residentes hipo-reactivos. Las células derivadas de monocitos son mediadores clave durante las respuestas inflamatorias en el tracto gastrointestinal. El reclutamiento de monocitos se asocia a menudo con el desarrollo de inflamación y daño epitelial en las mucosas. Los monocitos y macrófagos producen TNF- α durante la inflamación del colon ²⁵⁹ y el reclutamiento de monocitos Ly6C^{hi} (que pueden dar origen a macrófagos CX3CR1⁺ para mantener la homeostasis de las células residentes intestinales) también se requiere para la producción completa de otras citoquinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-6 durante la colitis inducida por DSS (sulfato sódico de dextrano), contribuyendo al desarrollo de la histopatología intestinal ²⁶⁰. En la infección por *C. difficile*, la señalización vía MyD88 es crucial para el reclutamiento de monocitos a la lámina propia del intestino grueso como así también la expresión de CCR2 ^{221,222} e IL-23 ²²².

Ha sido demostrado que, frente a diversas infecciones (ej. *Toxoplasma gondii*, *Citrobacter rodentium*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter hepaticus*), los monocitos clásicos (CD14^{hi} CD16⁻ en humanos o Ly6C⁺ en ratón) se acumulan rápidamente en la mucosa intestinal murina, reclutados desde la periferia. De hecho, ratones deficientes en CCL2 y CCR2 muestran un retraso en la eliminación de *C. rodentium* debido a la imposibilidad de reclutar monocitos, lo que implica el rol protector de los mismos en la respuesta inmune ²²⁰. El reclutamiento de monocitos clásicos también ocurre durante la inflamación estéril. En humanos, se ha descrito la acumulación de

células derivadas de monocitos clásicos durante la inflamación intestinal causada por la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa ^{220,261}. También ha sido propuesto que el reclutamiento de los monocitos clásicos sería importante para la interacción con células T ya que células del linaje monocítico/macrofágico son requeridas para mantener las células T productoras de IFN- γ (Th1) y productoras de IFN- γ e IL-17 (Th1/Th17) en la mucosa durante la infección por *C. rodentium* ²⁶².

Ha sido reportado que SLPs obtenidas a partir de un aislamiento clínico de *C. difficile* fueron capaces de inducir la secreción de IL-6 e IL-1 β por parte de monocitos humanos de dadores sanos provenientes de sangre periférica estimulados por 18 horas ²²⁵. También indujeron activación y maduración de CDs y una orientación de la respuesta adaptativa hacia un perfil mixto Th1/Th2 ²²⁵. Linevsky y col. observaron que monocitos activados con bajas concentraciones de toxina A o B de la cepa VPI 10463 de *C. difficile* liberan IL-8, factor quimioattractante de neutrófilos que facilita la extravasación e infiltración de estas células a los tejidos. Flegel y col. demostraron que las toxinas A y B de la cepa VPI 10463 (no hipervirulenta, altamente toxigenica) de *C. difficile* inducen secreción de citoquinas proinflamatorias en monocitos cultivados por una noche con las toxinas. En este sentido, la toxina B fue más eficaz en inducir IL-1 β , TNF- α e IL-6 que la toxina A. Los autores propusieron que las toxinas son activadoras de los monocitos humanos y que la inducción de estas células puede contribuir al daño local y sistémico en las enteropatías causadas por *C. difficile* ²²³. Finalmente, monocitos tratados con IFN- γ y toxina B resultaron más citotóxicos para las células diana U-937 comparados con los monocitos activados en ausencia de la toxina, y también aumentaron significativamente la secreción de TNF- α , mientras que el tratamiento únicamente con toxina B no indujo la producción de esta citoquina ²⁴³ a diferencia de lo observado por Flegel y col. ²²³. Por lo tanto, las SLPs y toxinas de *C. difficile* podrían estar involucradas en la regulación del balance de perfiles de monocitos pro y anti-inflamatorios.

En este capítulo hemos evaluado la expresión de SLAMF1 y de CD163 como así también la capacidad de interacción entre los monocitos de dadores sanos y pacientes con CDI y las cepas NAP1/BI/027 y endógena de *C. difficile*. Como se mencionó anteriormente, SLAMF1 contribuye al desarrollo de colitis en ratones e interviene en el reclutamiento de monocitos hacia tejidos intestinales inflamados ¹³⁹. En nuestros estudios, los dadores sanos mostraron mayores niveles de SLAMF1 cuando sus células mononucleares fueron estimuladas con *C. difficile* cepa NAP1/BI/027 inactivada por calor (CD Calor). Aunque con la cepa endógena inactivada por calor (End Calor) pudimos apreciar el mismo efecto, estos datos no pudieron analizarse estadísticamente debido al bajo número de muestras evaluadas. La obtención, crecimiento e

inactivación de la cepa endógena la hemos realizado recientemente en el laboratorio (Año 2021), por lo que la cantidad de algunos experimentos conducidos es reducida y los resultados aún son preliminares. También hemos evaluado la producción de TNF- α por citometría de flujo, detectando la mayor proporción de células productoras de esta citoquina frente al estímulo con CD Calor. Más aun, observamos que la mayoría de las células que produjeron TNF- α también expresaron SLAMF1, lo que podría sugerir un rol de SLAMF1 en la modulación de la secreción de citoquinas proinflamatorias. Aunque el estímulo con *C. difficile* inactivada con formol (CD Formol) muestra un aumento en los niveles de SLAMF1 de superficie y también de TNF- α , las diferencias no fueron significativas. Esta propiedad diferencial de CD Calor y CD Formol de inducir la expresión de estas moléculas podría deberse a cambios en los antígenos que permanecen disponibles una vez aplicado los tratamientos; presentando CD Calor la mayor capacidad de afectar las respuestas inmunes innatas.

En cuanto a los pacientes evaluados, sus monocitos aumentaron los niveles de SLAMF1 al ser expuestos a *C. difficile*, pero mostraron diferente comportamiento. Como mencionamos en sección de resultados, pudimos realizar estos estudios únicamente en dos pacientes cuya diferencia más llamativa fue el origen de la CDI. Mientras uno de los pacientes adquirió la CDI en un centro de salud (paciente CDI hospitalario), el otro resultó ser un caso de la comunidad (paciente CDI de la comunidad). Ambos mostraron un aumento en la expresión de SLAMF1 en la superficie de sus monocitos al ser estimulados con CD Calor y CD Formol, siendo el paciente CDI de la comunidad quien evidenció mayores cambios. Éste último también mostró un gran aumento en la expresión de SLAMF1 al exponer sus células mononucleares a la cepa endógena.

En línea con nuestros resultados, el peptidoglicano y el ácido lipoteicoico provenientes de *S. aureus* indujeron la expresión de SLAMF1 en monocitos humanos obtenidos a partir de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos y enriquecidos por selección positivas con microesferas magnéticas⁷⁹. Esto indica que las bacterias Gram positivas también pueden modular la expresión de SLAMF1 en monocitos. Los altos niveles de SLAMF1 observados en los donadores sanos y pacientes con CDI en este trabajo, junto a la inducción de la producción de TNF- α y a los bajos niveles de CD163 sugieren que *C. difficile* regula a la población monocítica induciendo un perfil proinflamatorio en los mismos. Cabe destacar que el desarrollo de un perfil proinflamatorio que migre al sitio de infección no siempre conlleva a un panorama detrimental, sino que puede contribuir a la resolución y contención de la enfermedad. De hecho, ha sido propuesto que señalización por IL-23 promueve el reclutamiento de monocitos Ly6C^{hi} Ly6G^{Mid} en el colon en respuesta a la colitis causada por *C. difficile*, pero que los monocitos en sí mismos no son los

principales impulsores de la expresión de citoquinas inflamatorias o de la histopatología intestinal observada²²². Los autores encontraron que no hubo disminución en la expresión de las citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 o TNF- α o reducción en la severidad de la histopatología colónica asociada con la ablación del reclutamiento de monocitos²²². Por lo tanto, resultaría interesante evaluar la subpoblación de monocitos involucrada en modular la expresión de SLAMF1-CD14/CD16 clásicos (CD14^{hi}CD16⁻ o LY6C^{hi} en ratón) o no clásicos/patrullantes (CD14^{low}CD16⁺ o LY6C^{low} en ratón)- como así también evaluar la expresión del eje CCL2-CCR2 que indicaría migración a la mucosa intestinal durante la infección por *C. difficile*.

Por otro lado, la acumulación de células que expresan CD163 en IBD se observó principalmente alrededor y dentro de los vasos sanguíneos, lo que sugiere que estas células son parcialmente reclutadas de la circulación sistémica; y el análisis de las células mononucleares circulantes mostró que los monocitos positivos para CD163 aumentaron en los pacientes en comparación con los controles. Curiosamente, la activación de CD163 con un anticuerpo aumentó los niveles de TNF- α , lo que podría contribuir a amplificar la respuesta inflamatoria²³⁸. A diferencia de estos antecedentes, en nuestro trabajo, los niveles de CD163 estudiados por citometría de flujo fueron muy bajos, tanto en los monocitos de donadores sanos como del paciente CDI de la comunidad estimulados con *C. difficile* NAP1/BI/027 y endógena por 24 horas. En conjunto con los resultados obtenidos en macrófagos derivados de monocitos, podemos considerar que CD163 no cumpliría un rol sobre monocitos y macrófagos durante la CDI, aunque, como mencionamos anteriormente, sería interesante evaluar los niveles de sCD163 como marcador de activación del linaje monocítico/macrofágico y la expresión de CD163 en el sitio de infección.

Finalmente evaluamos la capacidad de los monocitos de interactuar con *C. difficile*, utilizando ambas cepas inactivadas por calor acopladas a FITC (CD Calor FITC y End Calor FITC) por citometría de flujo. Tanto los donadores sanos como el paciente con CDI adquirida en la comunidad mostraron que, aproximadamente el 80% de sus monocitos interactuaron con CD Calor FITC y End Calor FITC. Más aun, al estudiar la expresión de SLAMF1 en estos monocitos, observamos que alrededor del 80% de los monocitos que expresaron SLAMF1 estaban interactuando con *C. difficile* en los donadores sanos. Porcentajes similares se encontraron en el paciente CDI de la comunidad analizado, donde casi la totalidad (>95%) de los monocitos SLAMF1 positivos fueron capaces de interactuar con ambas cepas bacterianas. Aunque estos resultados son preliminares, indicarían un rol de SLAMF1 como modulador de las respuestas fagocíticas de los monocitos.

Por último, es importante destacar que las diferentes cantidades de *C. difficile* inactivada por calor y formol, acopladas o no a FITC, no indujeron muerte celular; reforzando que los resultados

obtenidos a lo largo de este trabajo se deben exclusivamente a las respuestas inducidas por la bacteria. Además, para los estudios de interacción (SLAMF1-*C. difficile* y *C. difficile*-monocitos/macrófagos) hemos puesto a punto la tinción de las bacterias con el isómero I de FITC que no había sido descrita previamente.

En resumen, hemos contribuido a comprender el papel de monocitos y macrófagos frente a dos cepas toxigénicas de *C. difficile*. Hemos demostrado que CD163 no se modula en monocitos ni macrófagos derivados de monocitos humanos. Hemos propuesto también que *C. difficile* podría ser endocitada por macrófagos. Además, SLAMF1 modificó sus niveles de expresión solo en monocitos de dadores sanos y pacientes con CDI, pero no en macrófagos, sugiriendo un rol diferencial en los distintos tipos celulares durante la CDI. Apoyando esta idea, encontramos que la mayoría de los monocitos SLAMF1 positivos interactuaron con *C. difficile*, mientras que casi la totalidad de macrófagos que interaccionaron con la bacteria no expresaron SLAMF1 en su superficie. Más aun, SLAMF1 no sería un sensor microbiológico de *C. difficile* en macrófagos.

Con este trabajo pudimos establecer fundamentos que nos permitirán adentrarnos en diversas funciones de monocitos y macrófagos en la infección causada por *C. difficile*, tanto en muestras humanas como en un modelo *in vivo* de CDI, lo cual nos permitirá caracterizar las respuestas del linaje monocítico/macrofágico en el sitio diana de la bacteria. La modulación de la respuesta del hospedador podría ser un enfoque más efectivo para los pacientes que no resuelven la enfermedad, para lo cual resulta fundamental identificar los mecanismos que llevan a la generación de una respuesta inmune protectora o que conducen a la inmunopatogénesis.

Conclusiones Generales



En este trabajo de tesis doctoral hemos contribuido a la comprensión de la respuesta inmune innata frente a dos infecciones caracterizadas por disparar una fuerte respuesta proinflamatoria. Hemos abordado el rol de la Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAMF1) como sensor microbiológico de *Mycobacterium tuberculosis* y *Clostridioides difficile*, así como también su función como molécula coestimuladora en monocitos y macrófagos humanos. SLAMF1 ha demostrado poseer diferente comportamiento en monocitos y macrófagos estimulados con *M. tuberculosis* y distintas cepas toxigénicas de *C. difficile* (Fig. 1 y Fig.2).

Durante el capítulo uno de este trabajo hemos demostrado que SLAMF1 se expresa en muy bajos niveles en la superficie de monocitos de dadores sanos, mientras que su expresión aumenta cuando estas células se diferencian a macrófagos y se incrementa aún más y significativamente al exponer estas células a *M. tuberculosis*, no solo en la superficie sino intracelularmente. Sin embargo, un porcentaje muy bajo de macrófagos completamente diferenciados hacia perfiles M1, M2a y M2c expresaron SLAMF1 y *M. tuberculosis* no fue capaz de inducirlo. En cambio, células CD14 positivas provenientes de derrames pleurales mostraron mayores niveles de SLAMF1 que células CD14 positivas de sangre periférica de pacientes con Tuberculosis activa; por lo tanto, SLAMF1 podría cumplir un rol activo en el sitio de infección, validando también la elección de nuestro modelo de estudio.

La estimulación de los macrófagos con IFN- γ , pero no con IL-4 o IL-10, indujo los niveles de SLAMF1, sugiriendo que los estímulos proinflamatorios son los encargados de modular la expresión de SLAMF1. La línea celular THP-1 mostró un comportamiento similar y fue utilizada para conducir ciertos experimentos. La utilización de medios condicionados durante el cultivo de las células THP-1 mostraron que SLAMF1 se induce en la superficie de las células al interactuar con *M. tuberculosis* y no a causa de un efecto bystander.

En su rol como molécula coestimuladora, SLAMF1 no moduló la producción de TNF- α ni de IL-1 β inducida por *M. tuberculosis*. Por otro lado, la activación de SLAMF1 indujo la internalización de *M. tuberculosis* tanto sonicada como viva. Demostramos por primera vez que SLAMF1 se encuentra en endosomas tempranos y tardíos/lisosomas, sugiriendo que SLAMF1 podría regular la maduración de los endosomas una vez fagocitada *M. tuberculosis*. Observamos, además, que SLAMF1 fue capaz de interactuar bioquímicamente con *M. tuberculosis* y también hallamos colocalización entre esta molécula y la bacteria por microscopia confocal, resaltando a SLAMF1 como un nuevo sensor microbiológico de *M. tuberculosis*.

Como inhibir su degradación en el interior de los fagosomas constituye una de las principales estrategias de evasión de *M. tuberculosis* logrando evitar la apoptosis de los macrófagos y promoviendo la necrosis y diseminación, consideramos que evaluar el impacto de SLAMF1 en la eliminación de *M. tuberculosis* sería un enfoque muy interesante. Más estudios son necesarios para determinar si la bacteria es finalmente degradada en el interior de las vacuolas endocíticas en aquellos macrófagos en los que SLAMF1 promueve la internalización de *M. tuberculosis* y la maduración del endolisosoma. Además, profundizar el rol de SLAMF1 en otros mecanismos microbicidas, así como el impacto de este receptor en otras poblaciones celulares es necesario para lograr una mejor comprensión de las funciones de SLAMF1 en los macrófagos durante la Tuberculosis.

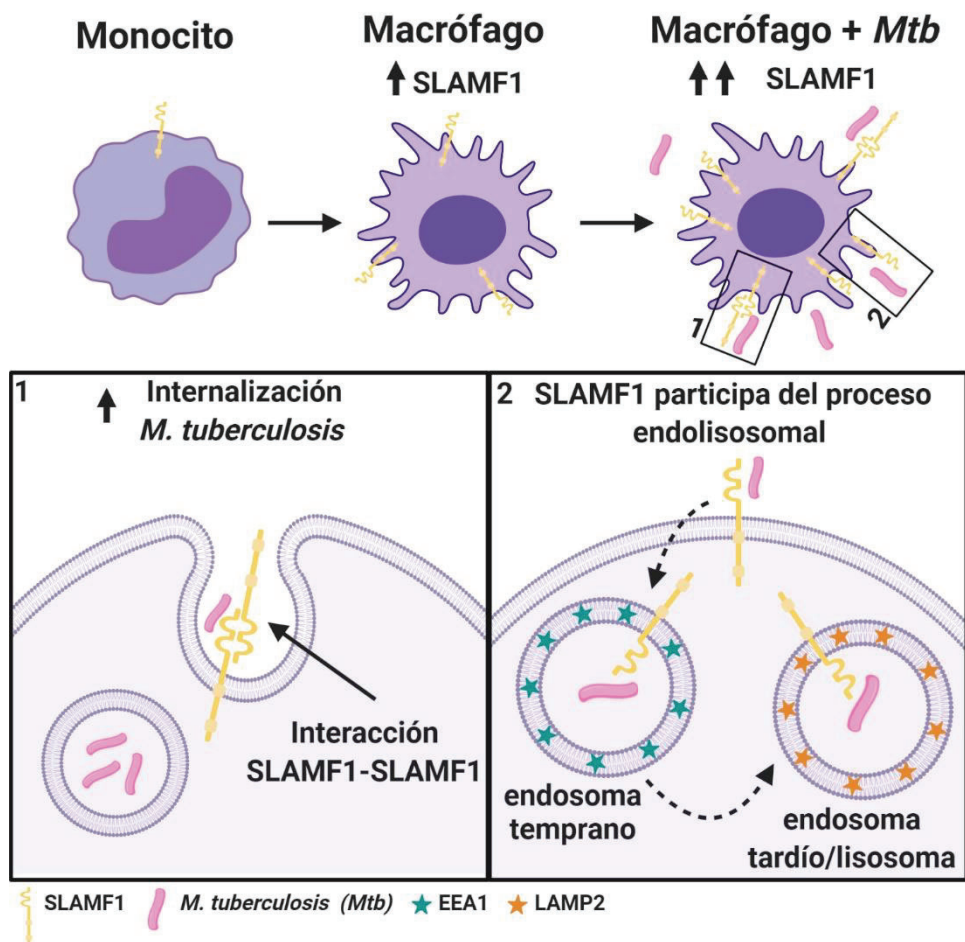


Figura 1. Modulación y rol de SLAMF1 como sensor microbiológico y regulador de la internalización de *M. tuberculosis* en macrófagos. (Adaptado de: Barbero AM et al. SLAMF1 signaling induces Mycobacterium tuberculosis uptake leading to endolysosomal maturation in human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2020;1–17. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MA0820-655RR>)

En el segundo capítulo de este trabajo, hemos demostrado que la expresión de SLAMF1 y de CD163 no se regula en la superficie de macrófagos derivados de monocitos de dadores sanos, incluso en cantidades crecientes de *C. difficile*, tanto de la cepa NAP1/BI/027 como de una cepa endógena aislada en nuestro laboratorio. Mientras que CD163 tampoco fue modulado en monocitos de dadores sanos y de pacientes con CDI, SLAMF1 si mostró un incremento cuando los monocitos fueron estimulados con ambas cepas de *C. difficile* inactivadas por calor; indicando un rol diferencial de SLAMF1 en monocitos y macrófagos frente a *C. difficile*.

Al evaluar el rol de SLAMF1 como posible sensor microbiológico de *C. difficile* en macrófagos humanos, observamos que no existe interacción bioquímica entre ellos, por lo cual SLAMF1 no sería capaz de sensar ninguna de estas dos cepas bacterianas. Si bien tanto los macrófagos como los monocitos mostraron capacidad de interactuar con la cepa NAP1/BI/027 y endógena de *C. difficile*, los monocitos lo hicieron en mayor medida. Más aún, los macrófagos que expresaron SLAMF1 en su mayoría no interactuaron con *C. difficile* mientras que los monocitos SLAMF1 positivos se encontraban casi en su totalidad interactuando con *C. difficile*; observación que refuerza la idea de que SLAMF1 no puede reconocer a *C. difficile* en macrófagos.

A pesar de ser resultados preliminares, encontramos diferencias en los niveles de expresión de SLAMF1 en los pacientes analizados. Aunque ambos mostraron un aumento de esta molécula en la superficie de sus monocitos, el paciente con origen de CDI hospitalaria mostró menor expresión de SLAMF1. Sería de gran interés evaluar los niveles proteicos de SLAMF1 en macrófagos derivados de monocitos de pacientes como así también la capacidad de éstos de interactuar con *C. difficile* con el fin de dilucidar si el comportamiento de estos macrófagos difiere de los dadores sanos.

También hemos propuesto que *C. difficile* podría ser endocitada por los macrófagos mediante mecanismos independientes de SLAMF1 ya que encontramos a ambas cepas de *C. difficile* posicionadas en macrófagos positivos para la molécula de superficie CD14 y para la molécula endosomal LAMP2, pero no para SLAMF1 por microscopia de fluorescencia. Resulta necesario emplear otras herramientas de microscopía para determinar fehacientemente la localización celular de la bacteria.

Finalmente, podemos concluir que tanto la cepa hipervirulenta NAP1/BI/027 como la cepa endógena de *C. difficile* poseen un comportamiento similar en las funciones evaluadas en monocitos y macrófagos en este trabajo. Este resultado nos plantea como interrogante si la colonización con la cepa endógena posee algún efecto diferencial sobre las respuestas inmunes

innatas comparado a las desencadenadas por las cepas patogénicas. Para complementar nuestro estudio acerca del rol de SLAMF1 frente a *C. difficile* y abordar el cuestionamiento anterior, sería vital evaluar otras funciones monocíticas/macrofágicas como la secreción de citoquinas, quemoquinas y otros factores solubles como así también la migración hacia el intestino y la relación con otras células del sistema inmune en muestras humanas y en el modelo *in vivo* de CDI que contamos en nuestro laboratorio.

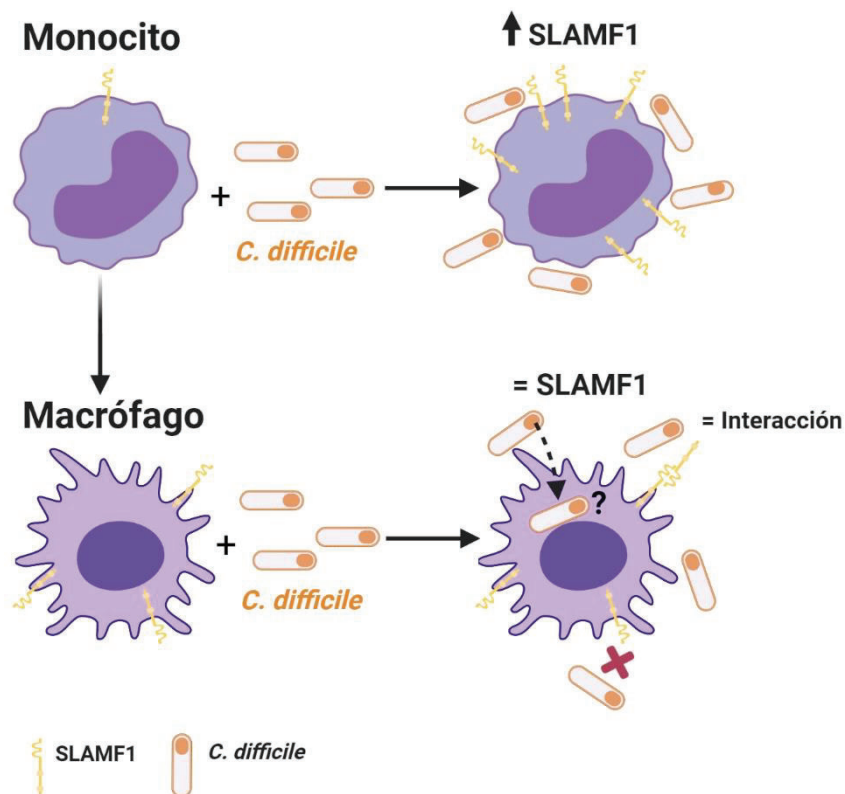


Figura 2. Regulación y rol de SLAMF1 frente a *C. difficile* en monocitos y macrófagos.

En resumen, hemos contribuido a comprender el rol de SLAMF1 en los monocitos y macrófagos, como así también el rol de estas células, en las infecciones producidas por *M. tuberculosis* y *C. difficile*. Tomados en conjunto, estos resultados evidencian que la expresión de SLAMF1 en los macrófagos y las funciones disparadas por SLAMF1 dependen del contexto al cual estén expuestas las células del sistema inmune. Los macrófagos, al ser los guardianes de la homeostasis inmunitaria intestinal, discriminando entre antígenos inocuos y patógenos potenciales, y al ser los primeros en encontrarse con *M. tuberculosis* en el pulmón teniendo el potencial de eliminar la bacteria o de convertirse en un nicho permisivo para su crecimiento, despiertan especial interés

como blanco de estudio. Por otro lado, SLAMF1 ya ha sido propuesto como target terapéutico en otros contextos inflamatorios. Conocer los mecanismos y las vías moleculares que median la respuesta inmune, identificando procesos que contribuyan a la resolución de las infecciones o que, por otro lado, puedan resultar perjudiciales para el desenlace de la enfermedad o comprender mecanismos de evasión puestos en marcha por los patógenos, permitiría el diseño de nuevos blancos inmunoterapéuticos. La modulación de la respuesta del hospedador podría ser un enfoque adyuvante a las terapias actuales para los pacientes que no resuelven eficientemente estas infecciones.

Bibliografía

1. Robert Koch. The etiology of tuberculosis by Dr. Robert Koch. *Rev Infect Dis*. 1982;251:287–296.
2. Geneva: World Health Organization. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2020. 2020.
3. Boletín sobre Tuberculosis en la Argentina. AÑO III - MARZO 2020. *Minist Salud Argentina*.
4. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*. 2013;3–66.
5. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;394:651–653.
6. Brennan PJ. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev Infect Dis*. 1989;11:420–430.
7. Chatterjee D, Lowell K, Rivoire B, et al. Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. Capping with mannosyl residues in some strains. *J Biol Chem*. 1992;267:6234–6239.
8. Churchyard G, Kim P, Shah NS, et al. What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. *J Infect Dis*. 2017;216:S629–S635.
9. Kumar A, Farhana A, Guidry L, et al. Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Rev Mol Med*;13 . Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1017/s1462399411002079.
10. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:581–591.
11. Crevel R van, Ottenhoff THM, Meer JWM van der. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Am Soc Microbiol*. 2005;15:294–309.
12. Mortaz E, Adcock IM, Tabarsi P, et al. Interaction of Pattern Recognition Receptors with Mycobacterium Tuberculosis. *J Clin Immunol*. 2015;35:1–10.
13. Stamm CE, Collins AC, Shiloh MU. Sensing of Mycobacterium tuberculosis and consequences to both host and bacillus. *Immunol Rev*. 2015;264:204–219.
14. Liu CH, Liu H, Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cell Mol Immunol*. 2017;14:963–975.
15. Boom WH. $\gamma\delta$ T cells and mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect*. 1999;1:187–195.
16. Guirado E, Schlesinger LS, Kaplan G. Macrophages in tuberculosis: Friend or foe. 2013 . Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1007/s00281-013-0388-2.
17. Schluger NW, Rom WN. State of the Art The host: Immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:679–691.
18. Urdahl K, Shafiani S, Ernst J. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 2011;4:288–293.
19. Endocytosis C, Hosokawa K, Ishimaru H, et al. The Lysosome Pathway Degrades CD81

- on the Cell Surface by Poly-ubiquitination and Clathrin-Mediated Endocytosis. *Biol Pharm Bull.* 2020;43:540–545.
20. Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol.* 2001;154:631–644.
 21. Vergne I, Chua J, Singh SB, et al. Cell Biology of Mycobacterium Tuberculosis Phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:367–394.
 22. Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, et al. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J.* 2007;26:313–324.
 23. Elliott MR, Koster KM, Murphy PS, et al. Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J Exp Med.* 2017;1387–1394.
 24. Zhai W, Wu F, Zhang Y, et al. The immune escape mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis. *Int J Mol Sci*;20. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3390/ijms20020340.
 25. Schlesinger LS, Azad AK, Torrelles JB, et al. Determinants of Phagocytosis, Phagosome Biogenesis and Autophagy for Mycobacterium tuberculosis. 2008.
 26. Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med.* 2001;22:189–216.
 27. Scherz-shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol*;17. Epub ahead of print 2007. DOI: 10.1016/j.tcb.2007.07.009.
 28. Korbel DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect.* 2008;10:995–1004.
 29. Stenger S. Immunological control of tuberculosis: Role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:24–28.
 30. Domingo-gonzalez R, Prince O, Cooper A, et al. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbiology Spectr.* 2016;4:1–58.
 31. Li X, Huang S, Yu T, et al. MiR-140 modulates the inflammatory responses of Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages by targeting TRAF6. *J Cell Mol Med.* 2019;23:5642–5653.
 32. Flynn JL, Chan J. IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:93–129.
 33. Mayer-barber KD, Andrade BB, Oland SD, et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature.* 2014;511:99–103.
 34. Gleeson LE, Sheedy FJ, Palsson-McDermott EM, et al. Cutting Edge: Mycobacterium tuberculosis Induces Aerobic Glycolysis in Human Alveolar Macrophages That Is Required for Control of Intracellular Bacillary Replication. *J Immunol.* 2016;196:2444–2449.
 35. Hackett EE, Charles-messance H, Leary SMO, et al. Mycobacterium tuberculosis limits host glycolysis and IL-1 β by restriction of PFK-m via microRNA-21. *Cell Rep.* 2020;30:124–136.

36. Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Nishimura T, et al. IL-1 β Promotes Antimicrobial Immunity in Macrophages by Regulating TNFR Signaling and caspase-3 activation*. *J Immunol*. 2012;190:4196–4204.
37. Flynn JAL, Chan J. Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis: Living with the enemy. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:450–455.
38. Fratti RA, Chua J, Deretic V. Induction of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Reduces Early Endosome Autoantigen 1 (EEA1) Recruitment to Phagosomal Membranes. *J Biol Chem*. 2003;278:46961–46967.
39. Cavalli V, Vilbois F, Corti M, et al. The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Mol Cell*. 2001;7:421–432.
40. Strong EJ, Smith Jurcic KL, Saini NK, et al. Identification of autophagy inhibiting factors of Mycobacterium tuberculosis by high throughput loss of function screening. *Infect Immun*. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1128/IAI.00269-20.
41. Shin D, Jeon B, Lee H, et al. Mycobacterium tuberculosis Eis Regulates Autophagy, Inflammation, and Cell Death through Redox-dependent Signaling. *PLoS Pathog*;6. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001230.
42. Chen D, Chen Y, Lin C, et al. MicroRNA-889 Inhibits Autophagy To Maintain Mycobacterial Survival in Patients with Latent Tuberculosis Infection by. *Am Soc Microbiol*. 2020;11:1–17.
43. Mukherjee P, Sureka K, Datta P, et al. Novel role of Wag31 in protection of mycobacteria under oxidative stress. *Mol Microbiol*. 2009;73:103–119.
44. Lamichhane G. Mycobacterium tuberculosis response to stress from reactive oxygen and nitrogen species. *Front Microbiol*. 2011;2:1–2.
45. Pahari S, Kaur G, Negi S, et al. Reinforcing the functionality of mononuclear phagocyte system to control tuberculosis. *Front Immunol*. 2018;9:1–17.
46. Kapsenberg ML. DENDRITIC-CELL CONTROL OF PATHOGEN-DRIVEN T-CELL POLARIZATION. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:984–993.
47. Bhatt K, Uzelac A, Mathur S, et al. B7 Costimulation Is Critical for Host Control of Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Immunol*. 2009;182:3793–3800.
48. Pasquinelli V, Quiroga MF, Martínez GJ, et al. Expression of Signaling Lymphocytic Activation Molecule- Associated Protein Interrupts IFN- γ Production in Human Tuberculosis. *J Immunol*. 2004;172:1177–1185.
49. Pasquinelli V, Townsend JC, Jurado JO, et al. IFN- γ production during active tuberculosis is regulated by mechanisms that involve IL-17, SLAM, and CREB. *J Infect Dis*;199. Epub ahead of print 2009. DOI: 10.1086/596742.
50. Pasquinelli V, Rovetta AI, Alvarez IB, et al. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases contributes to interferon γ production in response to Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis*. 2012;207:340–350.
51. Quiroga MF, Pasquinelli V, Martínez GJ, et al. Inducible Costimulator: A Modulator of IFN- γ Production in Human Tuberculosis. *J Immunol*. 2006;176:5965–5974.

52. Fernández Do Porto DA, Jurado JO, Pasquinelli V, et al. CD137 differentially regulates innate and adaptive immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2012;90:449–456.
53. Jurado JO, Pasquinelli V, Alvarez IB, et al. IL-17 and IFN- γ expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *J Leukoc Biol.* 2012;91:991–1002.
54. Quiroga MF, Jurado JO, Martínez GJ, et al. Cross-talk between CD31 and the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein during interferon- γ production against Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis*;196 . Epub ahead of print 2007. DOI: 10.1086/522522.
55. Dragovich M, Mor A. The SLAM family receptors: potential therapeutic targets for inflammatory and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2007;17:2–4.
56. Wu N, Veillette A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol.* 2016;38:45–51.
57. Ma CS, Nichols KE, Tangye SG. Regulation of Cellular and Humoral Immune Responses by the SLAM and SAP Families of Molecules. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:337–379.
58. Cocks BG, Chang CCJ, Carballido JM, et al. A novel receptor involved in T–cell activation. *Nature.* 1995;376:260–263.
59. Veillette A, Latour S. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:277–285.
60. Aversa G, Chang CC, Carballido JM, et al. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol.* 1997;158:4036 LP – 4044.
61. Meroni L, Fusi ML, Varchetta S, et al. Altered Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) Expression in HIV Infection and Redirection of HIV-Specific Responses. *Clin Immunol.* 1999;92:276–284.
62. Hamalainen H, Meissner S, Lahesmaa R. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *J Immunol Methods.* 2000;242:9–19.
63. Pasquinelli V, Townsend JC, Jurado JO, et al. HHS Public Access. *J Infect Dis.* 2009;199:661–665.
64. Bleharski JR, Niazi KR, Sieling PA, et al. Signaling Lymphocytic Activation Molecule Is Expressed on CD40 Ligand-Activated Dendritic Cells and Directly Augments Production of Inflammatory Cytokines. *J Immunol.* 2021;167:3174–3178.
65. Bence Rethi, Peter Gogolak, Istvan Szatmari, Agota Veres, Erika Erdos, Laszlo Nagy, Eva Rajnavolgyi, Cox Terhorst and AL. SLAM / SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *immunobiology.* 2006;107:2821–2829.
66. Wang N, Satoskar A, Faubion W, et al. The Cell Surface Receptor SLAM Controls T Cell and Macrophage Functions. *J Exp Med.* 2004;199:1255–1264.

67. Berger SB, Romero X, Ma C, et al. SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat Immunol*. 2010;11:920–927.
68. Calderón J, Maganto-Garcia E, Punzón C, et al. The receptor Slamf1 on the surface of myeloid lineage cells controls susceptibility to infection by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2012;8:38.
69. Poveda C, Herreros-Cabello A, Callejas-Hernandez F, et al. Interaction of Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family 1 (SLAMF1) receptor with *Trypanosoma cruzi* is strain- dependent and affects NADPH oxidase expression and activity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;1:1–22.
70. Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, et al. Slam (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*. 2000;406:893–897.
71. Tatsuo H, Yanagi Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol Immunol*. 2002;46:135–142.
72. Driel B van, Wang G, Liao G, et al. The cell surface receptor Slamf6 modulates innate immune responses during *Citrobacter rodentium* induced colitis. *Int Immunol*. 2015;27:447–457.
73. Degos C, Hysenaj L, Gonzalez-Espinoza G, et al. Omp25-dependent engagement of SLAMF1 by *Brucella abortus* in dendritic cells limits acute inflammation and favours bacterial persistence in vivo. *Cell Microbiol*. 2020;22:1–16.
74. Nau GJ, Richmond JFL, Schlesinger A, et al. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:1503–1508.
75. Silver RF, Walrath J, Lee H, et al. Human Alveolar Macrophage Gene Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Strains H37Ra and H37Rv. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;40:491–504.
76. Fan L, Wu X, Jin C, et al. MptpB promotes mycobacteria survival by inhibiting the expression of inflammatory mediators and cell apoptosis in macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:1–10.
77. LIGHT RW. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology*. 2010;15:451–458.
78. Minagawa H, Tanaka K, Ono N, et al. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol*. 2001;82:2913–2917.
79. Farina C, Theil D, Semlinger B, et al. Distinct responses to monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol*. 2004;16:799–809.
80. Theil D, Farina C, Meinel E. Differential expression of CD150 (SLAM) on monocytes and macrophages in chronic inflammatory contexts: Abundant in Crohn's disease, but not in multiple sclerosis [1]. *J Clin Pathol*. 2005;58:110–111.
81. Nau GJ, Richmond JFL, Schlesinger A, et al. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *PNAS*. 2016;99:1503–1508.
82. Song T, Dong C, Xiong S. Signaling lymphocyte-activation molecule SLAMF1 augments mycobacteria BCG-induced inflammatory response and facilitates bacterial clearance. *Int J Med Microbiol*. 2015;305:572–580.

83. Karampetsou MP, Comte D, Kis-Toth K, et al. Expression patterns of signaling lymphocytic activation molecule family members in peripheral blood mononuclear cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2017;12:1–17.
84. Romero X, Benítez D, March S, et al. Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue Antigens*. 2004;64:132–144.
85. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014;23:37–45.
86. Punnonen BJ, Cocks BG, Carballido JM, et al. Soluble and Membrane-bound Forms of Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) Induce Proliferation and Ig Synthesis by Activated Human B Lymphocytes. *J Exp Med*;185.
87. Mathiesen R, Eld HMS, Sørensen J, et al. Mannan Enhances IL-12 Production by Increasing Bacterial Uptake and Endosomal Degradation in *L. acidophilus* and *S. aureus* Stimulated Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2019;10:1–13.
88. Castillo-Velázquez U, Aranday-Cortés E, Gutiérrez-Pabello JA. Alternative activation modifies macrophage resistance to *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol*. 2011;151:51–59.
89. Van Driel BJ, Liao G, Engel P, et al. Responses to microbial challenges by SLAMF receptors. *Front Immunol*. 2016;7:1–14.
90. Calpe S, Wang N, Romero X, et al. The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2008;97:177–250.
91. Chen W, Syldath U, Bellmann K, et al. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol*. 1999;162:3212–9.
92. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, et al. Cutting Edge: Heat Shock Protein (HSP) 60 Activates the Innate Immune Response: CD14 Is an Essential Receptor for HSP60 Activation of Mononuclear Cells. *J Immunol*. 2000;164:13–17.
93. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:16–18.
94. Gratchev A, Schledzewski K, Guillot P, et al. Antigen-Presenting Cells : Molecular Repertoire , Immune Regulation , and Healing. *Ski Pharmacol Appl Ski Physiol*. 2001;14:272–279.
95. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41:14–20.
96. Balboa L, Romero MM, Basile JJ, et al. Paradoxical role of CD16+CCR2+CCR5+monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood. *J Leukoc Biol*. 2011;90:69–75.
97. Balboa L, Barrios-payan J, Gonz E, et al. Diverging biological roles among human monocyte subsets in the context of tuberculosis infection. *Clin Sci*. 2015;129:319–330.
98. Yurchenko M, Skjesol A, Ryan L, et al. SLAMF1 is required for TLR4-mediated TRAM-TRIF- dependent signaling in human macrophages. *J Cell Biol*. 2018;217:1411–1429.

99. Velten FW, Duperrier K, Bohlender J, et al. A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3(+) subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced allostimulatory capacity in vitro. *Eur J Immunol.* 2004;34:2800–2811.
100. McBride JM, Jung T, de Vries JE, et al. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol.* 2002;215:162–172.
101. Pasquinelli V, Quiroga MF, Martínez GJ, et al. Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol.* 2004;172:1177–1185.
102. Pasquinelli V, Townsend JC, Jurado JO, et al. IFN-gamma production during active tuberculosis is regulated by mechanisms that involve IL-17, SLAM, and CREB. *J Infect Dis.* 2009;199:661–665.
103. Ma C, Wang N, Detre C, et al. Receptor signaling lymphocyte-activation molecule family 1 (Slamf1) regulates membrane fusion and NADPH oxidase 2 (NOX2) activity by recruiting a Beclin-1/Vps34/ultraviolet radiation resistance-associated gene (UVRAG) complex. *J Biol Chem.* 2012;287:18359–18365.
104. Wang G, Van Driel BJ, Liao G, et al. Migration of myeloid cells during inflammation is differentially regulated by the cell surface receptors Slamf1 and Slamf8. *PLoS One.* 2015;10:1–18.
105. DRIEL B VAN, Liao G, Romero X, et al. Signaling Lymphocyte Activation Molecule Regulates Development of Colitis in Mice. *Gastroenterology.* 2012;143:1544-1554.e7.
106. Yurchenko M, Skjesol A, Ryan L, et al. SLA MF1 is required for TLR4-mediated TRAM-TRIF- dependent signaling in human macrophages. *J Cell Biol.* 2018;217:1411–1429.
107. Byrne AJ, Powell JE, O’Sullivan BJ, et al. Dynamics of human monocytes and airway macrophages during healthy aging and after transplant. *J Exp Med.* 2020;217:1–11.
108. Ito T, Kodama M. Demonstration by reverse transcription-polymerase chain reaction of multiple cytokine mRNA expression in bovine alveolar macrophages and peripheral blood mononuclear cells. *Res Vet Sci.* 1996;60:94–96.
109. Li J, Pritchard DK, Wang X, et al. cDNA microarray analysis reveals fundamental differences in the expression profiles of primary human monocytes, monocyte-derived macrophages, and alveolar macrophages. *J Leukoc Biol.* 2007;81:328–335.
110. Zaślona Z, Wilhelm J, Cakarova L, et al. Transcriptome profiling of primary murine monocytes, lung macrophages and lung dendritic cells reveals a distinct expression of genes involved in cell trafficking. *Respir Res.* 2009;10:1–16.
111. Juarez E, Nuñez C, Sada E, et al. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir Res.* 2010;11:1–13.
112. Poliska S, Csanky E, Szanto A, et al. Chronic obstructive pulmonary disease-specific gene expression signatures of alveolar macrophages as well as peripheral blood monocytes overlap and correlate with lung function. *Respiration.* 2011;81:499–510.
113. Veillette A. SLAM Family Receptors Regulate Immunity with and without SAP-related Adaptors. *J Exp Med.* 2004;199:1175–1178.

114. Veillette A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:56–66.
115. Bleharski JR, Niazi KR, Sieling PA, et al. Signaling Lymphocytic Activation Molecule Is Expressed on CD40 Ligand-Activated Dendritic Cells and Directly Augments Production of Inflammatory Cytokines. *J Immunol*. 2001;167:3174–3181.
116. Réthi B, Gogolák P, Szatmari I, et al. SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2006;107:2821–2829.
117. Giambartolomei GH, Zwerdling A, Bruno L, et al. Lipoproteins, Not Lipopolysaccharide, Are the Key Mediators of the Proinflammatory Response Elicited by Heat-Killed *Brucella abortus*. *J Immunol*. 2004;173:4635–4642.
118. Duncan JA, Barrionuevo P. Platelets Promote *Brucella abortus* Monocyte invasion by establishing complexes With Monocytes. *Front Immunol*;9 . Epub ahead of print 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01000.
119. Islam N, Kanost AR, Teixeira L, et al. Role of Cellular Activation and Tumor Necrosis Factor- α in the Early Expression of Mycobacterium tuberculosis 85B mRNA in Human Alveolar Macrophages . *J Infect Dis*. 2004;190:341–351.
120. Lee MR, Chang LY, Chang CH, et al. Differed IL-1 Beta Response between Active TB and LTBI Cases by Ex Vivo Stimulation of Human Monocyte-Derived Macrophage with TB-Specific Antigen. *Dis Markers*;2019 . Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1155/2019/7869576.
121. Aderem A, Underhill DM. MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593–623.
122. Fu LM, Fu-Liu CS. Is Mycobacterium tuberculosis a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis*. 2002;82:85–90.
123. Castaño D, Barrera LF, Rojas M. Mycobacterium tuberculosis alters the differentiation of monocytes into macrophages in vitro. *Cell Immunol*. 2011;268:60–67.
124. Khan TA, Mazhar H, Saleha S, et al. Interferon-Gamma Improves Macrophages Function against *M. tuberculosis* in Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients . *Chemother Res Pract*. 2016;2016:1–6.
125. Shen L, Gao Y, Liu Y, et al. PD-1/PD-L pathway inhibits *M.tb*-specific CD4+ T-cell functions and phagocytosis of macrophages in active tuberculosis. *Sci Rep*. 2016;6:1–9.
126. Mah N, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA. Outer membrane pore protein prediction in mycobacteria using genomic comparison. *Microbiology*. 2010;156:2506–2515.
127. Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, et al. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol*. 2010;18:109–116.
128. Siroy A, Mailaender C, Harder D, et al. Rv1698 of Mycobacterium tuberculosis represents a new class of channel-forming outer membrane proteins. *J Biol Chem*. 2008;283:17827–17837.

129. Song H, Sandie R, Wang Y, et al. Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2008;88:526–544.
130. Chen J, Zhong MC, Guo H, et al. SLAMF7 is critical for phagocytosis of haematopoietic tumour cells via Mac-1 integrin. *Nature*. 2017;544:493–497.
131. Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int*;2017 . Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1155/2017/9042851.
132. Hosokawa K, Ishimaru H, Watanabe T, et al. The lysosome pathway degrades CD81 on the cell surface by poly-ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis. *Biol Pharm Bull* . Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1248/bpb.b19-01097.
133. Miraglia MC, Rodriguez AM, Barrionuevo P, et al. *Brucella abortus* traverses brain microvascular endothelial cells using infected monocytes as a Trojan horse. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:1–11.
134. Parihar SP, Guler R, Khutlang R, et al. Statin therapy reduces the mycobacterium tuberculosis burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation. *J Infect Dis*. 2014;209:754–763.
135. Vergne I, Chua J, Deretic V. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *J Exp Med*. 2003;198:653–659.
136. Sturgill-koszycki AS, Schlesinger PH, Chakraborty P, et al. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science (80-)*. 1994;263:678–681.
137. Clemens BDL, Horwitz M a. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med*. 1995;181:257–270.
138. Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, et al. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem*. 1997;272:13326–13331.
139. DRIEL B VAN, Liao G, Romero X, et al. Signaling Lymphocyte Activation Molecule Regulates Development of Colitis in Mice. *Gastroenterology*. 2012;143:1544-1554.e7.
140. Srinivasan L, Ahlbrand S, Briken V. Interaction of mycobacterium tuberculosis with host cell death pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4:1–15.
141. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. 1998;47–57.
142. SUPLEMENTO RECOMENDACIONES INTERSOCIEDADES PARA DIAGNÓSTICO , TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN. *Med (Buenos Aires)*. 2020;80:1–32.
143. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, et al. Anaerobe Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and vot 1938 O ' Toole 1935) Pr e. *Anaerobe*. 2016;40:95–99.
144. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, et al. *Clostridium difficile* infection . DOI: 10.1038/nrdp.2016.20.
145. Zhang S, Palazuelos-Munoz S, Balsells EM, et al. Cost of hospital management of *Clostridium difficile* infection in United States-a meta-analysis and modelling study.

- BMC Infect Dis*;16 . Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1186/s12879-016-1786-6.
146. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, et al. Burden of Clostridium difficile infection in the United States. *N Engl J Med*. 2015;372:825–834.
 147. Cassini A, Plachouras D, Eckmanns T, et al. Burden of Six Healthcare-Associated Infections on European Population Health: Estimating Incidence-Based Disability-Adjusted Life Years through a Population Prevalence-Based Modelling Study. *PLoS Med*. 2016;13:1–16.
 148. Mastrantonio P, Rupnik M. Updates on Clostridium difficile in Europe. 2018 . Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-72799-8_15.
 149. Curcio D, Cané A, Fernández FA, et al. Clostridium difficile-associated Diarrhea in Developing Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infect Dis Ther*. 2019;8:87–103.
 150. Fernandez Canigia L, Nazar J, Arce M, et al. [Clostridium difficile diarrhea: frequency of detection in a medical center in Buenos Aires, Argentina]. *Rev Argent Microbiol*. 2001;33:101–107.
 151. Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S. Clostridium difficile-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe*. 2003;9:113–116.
 152. Lopardo G, Morfin-Otero R, Moran-Vazquez II, et al. Epidemiology of Clostridium difficile: A hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. *Brazilian J Infect Dis*. 2015;19:8–14.
 153. Burke KE, Lamont JT. Clostridium difficile Infection : A Worldwide Disease. 2014;8:1–6.
 154. McDonald LC, Coignard B, Dubberke E, et al. Recommendations for surveillance of Clostridium difficile-associated disease. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28:140–145.
 155. Hernández Del Pino RE, Barbero AM, Español LÁ, et al. The adaptive immune response to Clostridioides difficile : A tricky balance between immunoprotection and immunopathogenesis. *J Leukoc Biol*. 2021;109:195–210.
 156. Kim J, Seo MR, Kang JO, Kim Y, Hong SP PH. Clinical characteristics of relapses and re-infections in Clostridium difficile infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:1198–1204.
 157. Durovic A, Widmer AF, Frei R, et al. Distinguishing Clostridium difficile Recurrence From Reinfection: Independent Validation of Current Recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38:891–896.
 158. Drekonja DM. Clostridium difficile infection : current , forgotten and emerging treatment options. 2014;3:547–557.
 159. Elliott B, Androga GO, Knight DR, et al. Clostridium difficile infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* . Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.12.018.
 160. Balassiano IT, Yates EA, Domingues RMCP, et al. Clostridium difficile : a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. 2016;169–179.
 161. Legaria MC, Lumelsky G, Rossetti S. Clostridium difficile -associated diarrhea from a

- general hospital in Argentina. *Anaerobe*. 2003;9:113–116.
162. Gupta A, Khanna S. Community-acquired clostridium difficile infection: An increasing public health threat. *Infect Drug Resist*. 2014;7:63–72.
 163. Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM, et al. Epidemiology of community-associated Clostridium difficile infection, 2009 through 2011. *JAMA Intern Med*. 2013;173:1359–1367.
 164. Brown AWW, Wilson RB. Clostridium difficile colitis and zoonotic origins—a narrative review. *Gastroenterol Rep*. 2018;6:157–166.
 165. Hensgens MPM, Keessen EC, Squire MM, et al. Clostridium difficile infection in the community: A zoonotic disease? *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:635–645.
 166. Weese JS, Salgado-Bierman F, Rupnik M, et al. Clostridium (Clostridioides) difficile shedding by polar bears (Ursus maritimus) in the Canadian Arctic. *Anaerobe*. 2019;57:35–38.
 167. Chang JY, Antonopoulos DA, Kalra A, et al. Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea. *J Infect Dis*. 2008;197:435–438.
 168. Keller JJ, Kuijper EJ. Treatment of recurrent and severe Clostridium difficile infection. *Annu Rev Med*. 2015;66:373–386.
 169. PRICE HELAB, HONOUR P. CLOSTRIDIUM DIFFICILE AND THE AETIOLOGY OF PSEUDOMEMBRANOUS COLITIS. *Lancet*. 1978;1063–1066.
 170. Abt MC, Mckenney PT, Pamer EG. Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Publ Gr* . Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.108.
 171. Buonomo EL, Petri WA. Anaerobe The microbiota and immune response during Clostridium dif fi cile infection. 2016;1–6.
 172. Chen S, Sun C, Wang H, et al. The Role of Rho GTPases in Toxicity of Clostridium difficile Toxins. 2015;5254–5267.
 173. Carroll KC, Bartlett JG. Biology of Clostridium difficile : Implications for Epidemiology and Diagnosis. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65:501–521.
 174. Rodríguez-pardo D, Mirelis B, Navarro F. Infecciones producidas por Clostridium difficile. *Med Clin (Barc)*. 2013;31:254–263.
 175. Janoir C. Anaerobe Virulence factors of Clostridium dif fi cile and their role during infection. 37 . Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2015.10.009.
 176. Quesada-Gómez C, Rodríguez C, Gamboa-Coronado MDM, et al. Emergence of Clostridium difficile NAP1 in Latin America. *J Clin Microbiol*. 2010;48:669–670.
 177. Martin JSH, Monaghan TM, Wilcox MH. Clostridium difficile infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nat Publ Gr* . Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.25.
 178. Vohra P, Poxton IR. Induction of cytokines in a macrophage cell line by proteins of Clostridium difficile. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65:96–104.

179. Pechine S, Anne Collignon. Immune responses induced by *Clostridium difficile*. *Ana*. 2016;1–11.
180. Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, et al. *Clostridium difficile* virulence factors : Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. 2014;579–593.
181. Durovic A, Widmer AF, Tschudin-Sutter S. New insights into transmission of *Clostridium difficile* infection—narrative review. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:483–492.
182. Kim K, Fekety R, Batts DH, et al. Isolation of *Clostridium difficile* from the Environment and Contacts of Patients with Antibiotic-Associated Colitis. *J Infect Dis*. 1981;143:42–50.
183. FEKETY R, KIM Ky-H, BROWN D, et al. Epidemiology of Antibiotic-Associated Colitis Isolation of *Clostridium Difficile* from the Hospital Environment. *Am J Med*. 1981;70:906–908.
184. Rutala WA, Weber DJ. Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities. *Clin Microbiol*. 1997;10:597–610.
185. John B, Havill NL, Otter JA, et al. Impact of Hydrogen Peroxide Vapor Room Decontamination on *Clostridium difficile* Environmental Contamination and Transmission in a Healthcare Setting. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29:723–729.
186. Rodriguez C, Taminiau B, Bouchafa L, et al. *Clostridium difficile* beyond stools: dog nasal discharge as a possible new vector of bacterial transmission. *Heliyon*. 2019;5:e01629.
187. Barbut F, Petit J. Epidemiology of *Clostridium difficile* -associated infections. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7:405–410.
188. Sunenshine RH, McDonald LC. *Clostridium difficile* -associated disease : New challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med*;73:187–197.
189. Postma N, Kiers D, Pickkers P. International Journal of Antimicrobial Agents The challenge of *Clostridium difficile* infection : Overview of clinical manifestations , diagnostic tools and therapeutic options. 2015;46:47–50.
190. Carrie A. Cowardin and William A Petri Jr. Host Recognition of *Clostridium difficile* and the Innate Immune Response. *Anaerobe*. 2014;30:205–209.
191. Martin JSH, Monaghan TM, Wilcox MH. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nat Publ Gr* . Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.25.
192. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. 2017;0:1823–1836.
193. Tomkovich S. Microbiota and host immune responses : a love – hate relationship. 2015;1–10.
194. Immunology T. The gut microbiota and immune-regulation : the fate of health and disease . Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1038/cti.2016.61.
195. Bäumler AJ, Sperandio & V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016;535:85–93.
196. Maslowski KM, Mackay CR. Diet , gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*. 2011;12:5–9.

197. Maslowski KM, Mackay CR. c o m m e n t a r y Diet , gut microbiota and immune responses. *Nat Publ Gr*. 2011;12:5–9.
198. Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut . DOI: 10.1038/nature18849.
199. Hryckowian AJ, Pruss KM, Sonnenburg JL. The emerging metabolic view of *Clostridium difficile* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2017;35:42–47.
200. Staley, C.; Weingarden, A. R.; Khoruts, A.; Sadowsky MJ. Interaction of Gut Microbiota with Bile Acid Metabolism and its Influence on Disease States. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101:47–64.
201. Ridlon JM, Hylemon PB. Identification and characterization of two bile acid coenzyme A transferases from *Clostridium scindens*, a bile acid 7 α -dehydroxylating intestinal bacterium. *J Lipid Res*. 2012;53:66–76.
202. Rea MC, Dobson A, O’Sullivan O, et al. Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:4639–4644.
203. Trzasko A, Leeds JA, Praestgaard J, et al. Efficacy of LFF571 in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:4459–4462.
204. Solomon K. The host immune response to *Clostridium difficile* infection. 2013;19–35.
205. Hasegawa M, Kamada N, Jiao Y, et al. Protective Role of Commensals against *Clostridium difficile* Infection via an IL-1 β -Mediated Positive-Feedback Loop. *J Immunol*. 2012;189:3085–3091.
206. Hasegawa M, Yamazaki T, Kamada N, et al. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1 Mediates Recognition of *Clostridium difficile* and Induces Neutrophil Recruitment and Protection against the Pathogen. *J Immunol*. 2011;186:4872–4880.
207. Jarchum I, Liu M, Shi C, et al. Critical role for myd88-Mediated Neutrophil recruitment during *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun*. 2012;80:2989–2996.
208. Huang AM, Marini BL, Frame D, et al. Risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2014;16:744–750.
209. Luo R, Greenberg A, Stone CD. Outcomes of *Clostridium difficile* Infection in Hospitalized Leukemia Patients: A Nationwide Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;36:794–801.
210. Kelly CP, Becker S, Linevsky JK, et al. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. *J Clin Invest*. 1994;93:1257–1265.
211. Castagliuolo I, Keates AC, Wang CC, et al. *Clostridium difficile* toxin A stimulates macrophage-inflammatory protein-2 production in rat intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 1998;160:6039–45.
212. Chen Y-S, Chen I-B, Pham G, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells protect against *Clostridium difficile* infection. *J Clin Invest*. 2020;130:2377–2390.
213. Jr RM, Petri WA. Immune responses to *Clostridium difficile* infection Rajat. *Trends Mol*

- Med.* 2013;18:658–666.
214. Bain CC, Mowat AM. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunologica.* 2014;260:102–117.
 215. Abt MC, Lewis BB, Caballero S, et al. Innate immune defenses mediated by two ilc subsets are critical for protection against acute clostridium difficile infection. *Cell Host Microbe.* 2015;18:27–37.
 216. Eberl G, Colonna M, Santo JP Di, et al. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science (80-).* 2015;348:879–886.
 217. Abt MC, Mckenney PT, Pamer EG. Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Publ Gr .* Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.108.
 218. Frisbee AL, Saleh MM, Young MK, et al. IL-33 drives group 2 innate lymphoid cell-mediated protection during Clostridium difficile infection. *Nat Commun.* 2019;10:1–13.
 219. Na YR, Stakenborg M, Seok SH, et al. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16:531–543.
 220. Bain CC, Mowat AMI. The monocyte-macrophage axis in the intestine. *Cell Immunol.* 2014;291:41–48.
 221. Jarchum I, Liu M, Shi C, et al. Critical Role for MyD88-Mediated Neutrophil Recruitment during Clostridium difficile Colitis. *Infect Immun.* 2012;80:2989–2996.
 222. Mcdermott AJ, Falkowski NR, Mcdonald RA, et al. Role of interferon- γ and inflammatory monocytes in driving colonic inflammation during acute Clostridium difficile infection in mice. *Immunology.* 2016;150:468–477.
 223. Flegel WA, Muller F, Daubener W, et al. Cytokine response by human monocytes to Clostridium difficile toxin A and toxin B. *Infect Immun.* 1991;59:3659–3666.
 224. Linevsky JK, Pothoulakis C, Keates S, et al. IL-8 release and neutrophil activation by Clostridium difficile toxin-exposed human monocytes. *Am Physiol Soc.* 1997;1333–1340.
 225. Maria C, Cerquetti M, Fedele G, et al. Surface layer proteins from Clostridium difficile induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. *Microbes Infect.* 2006;8:2640–2646.
 226. Solomon K, Webb J, Ali N, et al. Monocytes Are Highly Sensitive to Clostridium difficile Toxin A-Induced Apoptotic and Nonapoptotic Cell Death. *Infect Immun.* 2005;73:1625–1634.
 227. Mahida YR, Galvin A, Makh S, et al. Effect of Clostridium difficile Toxin A on Human Colonic Lamina Propria Cells : Early Loss of Macrophages Followed by T-Cell Apoptosis. *Infect Immun.* 1998;66:5462–5469.
 228. Collins LE, Lynch M, Marszalowska I, et al. Surface layer proteins isolated from Clostridium difficile induce clearance responses in macrophages. *Microbes Infect.* 2014;16:391–400.
 229. Ng J, Hirota SA, Gross O, et al. Clostridium difficile toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology.* 2010;139:542-

552.e3.

230. Liu YH, Chang YC, Chen LK, et al. The ATP-P2X7 signaling axis is an essential sentinel for intracellular *Clostridium difficile* pathogen-induced inflammasome activation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:1–14.
231. Paredes-Sabja D, Cofre-Araneda G, Brito-Silva C, et al. *Clostridium difficile* Spore-Macrophage Interactions: Spore Survival. *PLoS One.* 2012;7:e43635.
232. Modi N, Gulati N, Solomon K, et al. Differential Binding and Internalization of *Clostridium difficile* Toxin A by Human Peripheral Blood Monocytes, Neutrophils and Lymphocytes. *Basic Immunol.* 2011;74:264–271.
233. Chen X, Yang X, Anda J De, et al. *Clostridioides difficile* Toxin A Remodels Membranes and Mediates DNA Entry Into Cells to Activate Toll Like Receptor 9 Signaling. *Gastroenterology.* 2020;159:2181–2192.
234. Mehrle S, Schmidt J, Markus WB, et al. Enhancement of anti-tumor activity in vitro and in vivo by CD150 and SAP. *Mol Immunol.* 2008;45:796–804.
235. Mathiesen R, Eld HMS, Sørensen J, et al. Mannan Enhances IL-12 Production by Increasing Bacterial Uptake and Endosomal Degradation in *L. acidophilus* and *S. aureus* Stimulated Dendritic Cells. *Front Immunol*;10. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02646.
236. Skytthe MK, Graversen JH, Moestrup SK. Targeting of CD163 + Macrophages in Inflammatory and Malignant Diseases. *Int J Mol Sci*;21.
237. Demetter P, Vos M De, Huyse JA Van, et al. Colon mucosa of patients both with spondyloarthritis and Crohn's disease is enriched with macrophages expressing the scavenger receptor CD163. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:321–324.
238. Franz E, Caruso R, Stolfi C, et al. Lesional Accumulation of CD163-Expressing Cells in the Gut of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One.* 2013;8:1–10.
239. Etienne-Mesmin L, Chassaing B, Adekunle O, et al. Toxin-positive *Clostridium difficile* latently infect mouse colonies and protect against highly pathogenic *C. difficile*. *Gut.* 2018;67:860–871.
240. Treatment Options for *Clostridioides difficile* infection. *Eur Biopharm Rev.* 2020;October:12–14.
241. Miro-Blanch J, Yanes O. Epigenetic regulation at the interplay between gut microbiota and host metabolism. *Front Genet.* 2019;10:1–9.
242. Na YR, Stakenborg M, Seok SH, et al. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16:531–543.
243. Siffert J, Baldacini O, Kuhry J, et al. Effects of *Clostridium difficile* Toxin B on Human Monocytes and Macrophages: Possible Relationship with Cytoskeletal Rearrangement. *Am Soc Microbiol.* 1993;61:1082–1090.
244. Ng J, Hirota SA, Gross O, et al. *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology.* 2010;139:542-

552.e3.

245. Collins LE, Lynch M, Marszalowska I, et al. Surface layer proteins isolated from *Clostridium difficile* induce clearance responses in macrophages. *Microbes Infect.* 2014;XX:1–10.
246. Gerding DN, Sambol SP, Johnson S. Non-toxigenic clostridioides (formerly clostridium) *difficile* for prevention of *C. difficile* infection: From bench to bedside back to bench and back to bedside. *Front Microbiol.* 2018;9:1–13.
247. Maslanka JR, Gu CH, Zarin I, et al. Detection and elimination of a novel non-toxigenic *Clostridioides difficile* strain from the microbiota of a mouse colony. *Gut Microbes.* 2020;12:1–15.
248. Wilson KH, Sheagren JN. Antagonism of toxigenic *Clostridium difficile* by nontoxigenic *C. difficile*. *J Infect Dis.* 1983;147:733–736.
249. BORRIELLO SP, BARCLAY FE. PROTECTION OF HAMSTERS AGAINST CLOSTRIDIUM DIFFICILE ILEOCAECITIS BY PRIOR COLONISATION WITH NON-PATHOGENIC STRAINS. *J MED MICROBIOL.* 1985;19:339–350.
250. Corthier G, Muller MC. Emergence in gnotobiotic mice of nontoxigenic clones of *Clostridium difficile* from a toxinogenic one. *Infect Immun.* 1988;56:1500–1504.
251. Nagaro KJ, Phillips ST, Cheknis AK, et al. Nontoxigenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:5266–5270.
252. Gerding DN, Meyer T, Lee C, et al. Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C difficile* infection: A Randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2015;313:1719–1727.
253. Leslie JL, Jenior ML, Barron KCVAKSMR, et al. Protection from lethal *Clostridioides difficile* infection via intraspecies competition for co-germinant. *Am Soc Microbiol.* 2021;27:191–194.
254. Fernández-canigia CL, Dese J, Castello L, et al. RECOMENDACIONES SOBRE EL TIPO DE MUESTRA Y LA OPORTUNIDAD DE HACER DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO DE LA INFECCION POR *Clostridioides difficile* (ICD). *CONSENSO INTERSOCIEDADES PARA DIAGNÓSTICO, Trat Y PREVENCIÓN LAS Infec POR CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE.*
255. Davis BH, Zarev P V. Human Monocyte CD163 Expression Inversely Correlates With Soluble CD163 Plasma Levels. *Clin Cytom.* 2005;22:16–22.
256. Bain CC, Scott CL, Gudjonsson S, et al. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C hi monocyte precursors. *Mucosal Immunol*;6 . Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1038/mi.2012.89.
257. Paredes-Sabja D, Cofre-Araneda G, Brito-Silva C, et al. *Clostridium difficile* Spore-Macrophage Interactions: Spore Survival. *PLoS One.* 2012;7:e43635.
258. Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: A control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy.* 2008;4:510–512.
259. Platt AM, Bain CC, Bordon Y, et al. An Independent Subset of TLR Expressing CCR2-

- Dependent Macrophages Promotes Colonic Inflammation. *J Immunol.* 2010;184:6843–6854.
260. Zigmond E, Varol C, Farache J, et al. Article Ly6C hi Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells. *Immunity.* 2012;37:1076–1090.
261. Mowat AMI, Bain CC. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J Innate Immun.* 2011;3:550–564.
262. Schreiber HA, Loschko J, Karssemeijer RA, et al. Intestinal monocytes and macrophages are required for T cell polarization in response to *Citrobacter rodentium*. *J Exp Med.* 2013;210:2025–2039.
263. Cyman M, S TJ, Kmiec Z. Advances in Medical Sciences Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. 2017;62:1–16.
264. Shen X, Du J, Guan W, et al. The balance of intestinal Foxp3 + regulatory T cells and Th17 cells and its biological significance. 2014;353–362.
265. Darkoh C, Turnwald BP, Koo HL, et al. Colonic immunopathogenesis of *Clostridium difficile* infections. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21:509–517.
266. Buonomo EL, Petri jr WA. The microbiota and immune response during *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe.* 2017;41:79–84.
267. Kim MN, Koh SJ, Kim JM, et al. *Clostridium difficile* infection aggravates colitis in interleukin 10-deficient mice. *World J Gastroenterol.* 2014;20:17084–17091.
268. Yacyshyn MB, Reddy TN, Plageman LR, et al. *Clostridium difficile* recurrence is characterized by pro-inflammatory peripheral blood mononuclear cell (PBMC) phenotype. 2017;1260–1273.
269. Jafari N V., Kuehne SA, Bryant CE, et al. *Clostridium difficile* Modulates Host Innate Immunity via Toxin-Independent and Dependent Mechanism(s). *PLoS One*;8 . Epub ahead of print July 29, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0069846.
270. Jafari N V., Songane M, Stabler RA, et al. Host immunity to *Clostridium difficile* PCR ribotype 017 strains. *Infect Immun.* 2014;82:4989–4996.
271. Brun P, Scarpa M, Grillo A, et al. *Clostridium difficile* TxAC314 and SLP-36kDa enhance the immune response toward a co-administered antigen. *J Med Microbiol.* 2008;57:725–731.
272. Castagliuolo I, Sardina M, Brun P, et al. *Clostridium difficile* toxin A carboxyl-terminus peptide lacking ADP-ribosyltransferase activity acts as a mucosal adjuvant. *Infect Immun.* 2004;72:2827–2836.

El presente manuscrito corresponde a la última versión de la tesis doctoral **Rol de SLAMF1 en la función de los macrófagos: SLAMF1 ¿un nuevo sensor microbiológico en las infecciones bacterianas?** de la Lic. Angela María Barbero dirigida por la Dra. Virginia Pasquinelli, correspondiente al Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología de la UNSAM defendida el 1 de Julio de 2021.

Tribunal evaluador: Dr. Luis Pablo Schierloh (Instituto de Investigación y desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática, IBB CONICET-Universidad Nacional de Entre Ríos, UNER), Dra. Bettina Bongiovanni (Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER) CONICET-Universidad Nacional de Rosario, UNR) y Dra. Mirta Lorena Coria (Instituto de Investigaciones Biotecnológicas- UNSAM-CONICET)



Dra. Barbero, Angela María



Dra. Pasquinelli, Virginia

Agosto, 2022
Junín, Buenos Aires, Argentina.