



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	¡Error! Marcador no definido.
Introducción	¡Error! Marcador no definido.
INFECCION POR <i>Clostridioides difficile</i> . Historia y epidemiología	¡Error! Marcador no definido.
<i>Clostridioides difficile</i>	¡Error! Marcador no definido.
Transmisión de la CDI	¡Error! Marcador no definido.
Microbiota	¡Error! Marcador no definido.
Inmunidad frente a <i>Clostridioides difficile</i>	¡Error! Marcador no definido.
Respuesta Inmune Innata	¡Error! Marcador no definido.
Macrófagos y monocitos	¡Error! Marcador no definido.
Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAMF1).	¡Error! Marcador no definido.
Objetivos	¡Error! Marcador no definido.
Objetivo General	¡Error! Marcador no definido.
Objetivos específicos.....	¡Error! Marcador no definido.
Materiales y Métodos	¡Error! Marcador no definido.
Muestras humanas.....	¡Error! Marcador no definido.
Antígenos y cepas bacterianas	¡Error! Marcador no definido.
Cultivo celular.....	¡Error! Marcador no definido.
Citometría de Flujo.....	¡Error! Marcador no definido.
Ensayos de interacción entre SLAMF1- <i>C. difficile</i>	¡Error! Marcador no definido.
Microscopía de Fluorescencia	¡Error! Marcador no definido.
Análisis estadístico	¡Error! Marcador no definido.
Resultados	¡Error! Marcador no definido.
La cepa NAP1/BI/027 de <i>C. difficile</i> no induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos.....	¡Error! Marcador no definido.
SLAMF1 no interactúa con la cepa NAP1/BI/027 de <i>C. difficile</i>	¡Error! Marcador no definido.

La cepa NAP1/BI/027 de <i>C. difficile</i> interacciona con los macrófagos humanos por un mecanismo independiente de SLAMF1.....	¡Error! Marcador no definido.
La cepa endógena de <i>C. difficile</i> no induce la expresión de SLAMF1 en macrófagos humanos.....	¡Error! Marcador no definido.
SLAMF1 no interactúa con la cepa endógena de <i>C. difficile</i> ..	¡Error! Marcador no definido.
SLAMF1 no induce la interacción de la cepa endógena de <i>C. difficile</i> y los macrófagos humanos.....	¡Error! Marcador no definido.
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	¡Error! Marcador no definido.
Las cepas NAP1/BI/027 y endógena de <i>C. difficile</i> interaccionan con células CD14 positivas de dadores sanos y pacientes con CDI	¡Error! Marcador no definido.
Discusión	¡Error! Marcador no definido.
Conclusiones Generales	95
Bibliografía	98

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 García, 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.

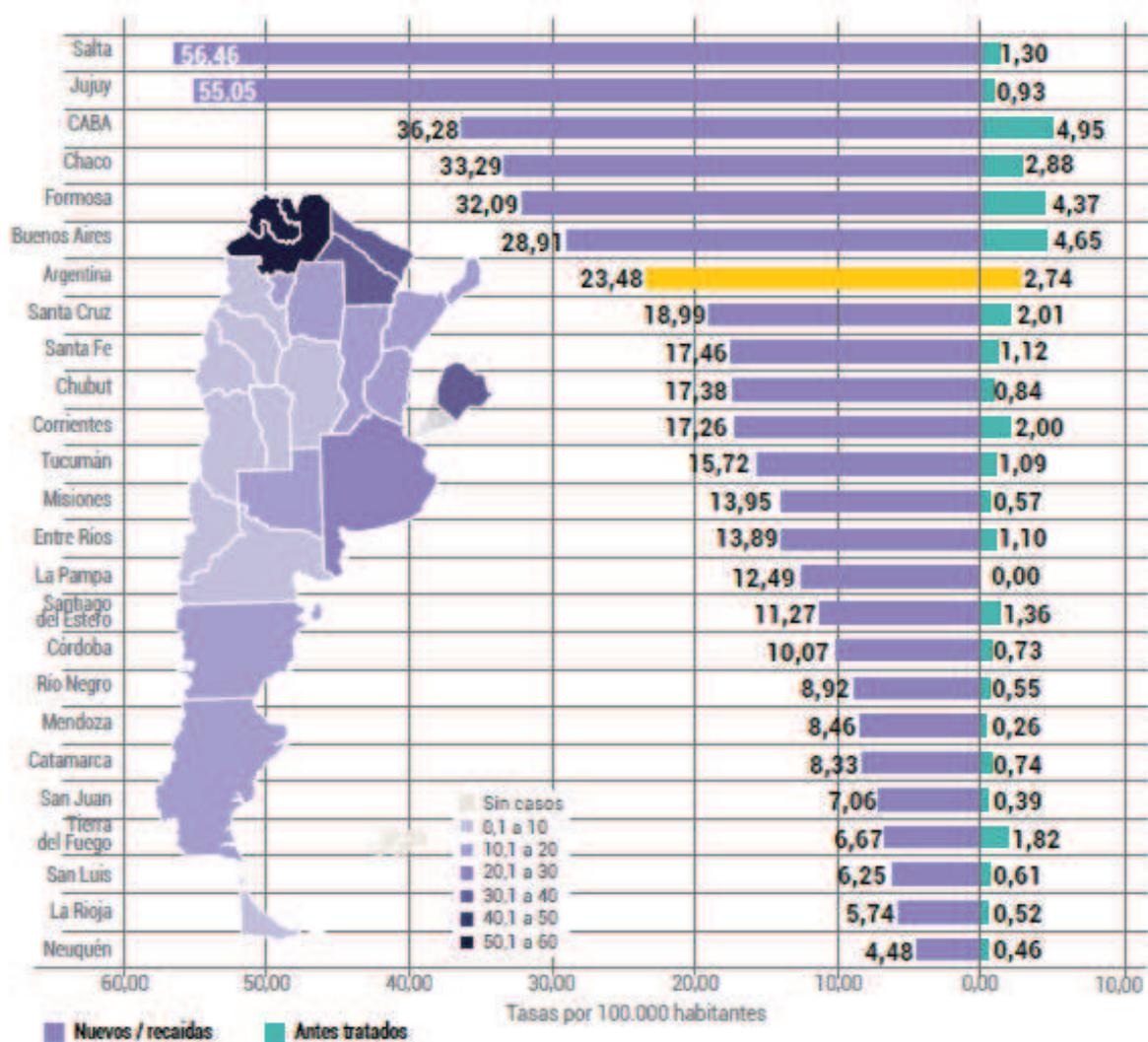


Fig. 1 Tasas de Tuberculosis por jurisdicción según clasificación al inicio del tratamiento en Argentina en el año 2018.

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.

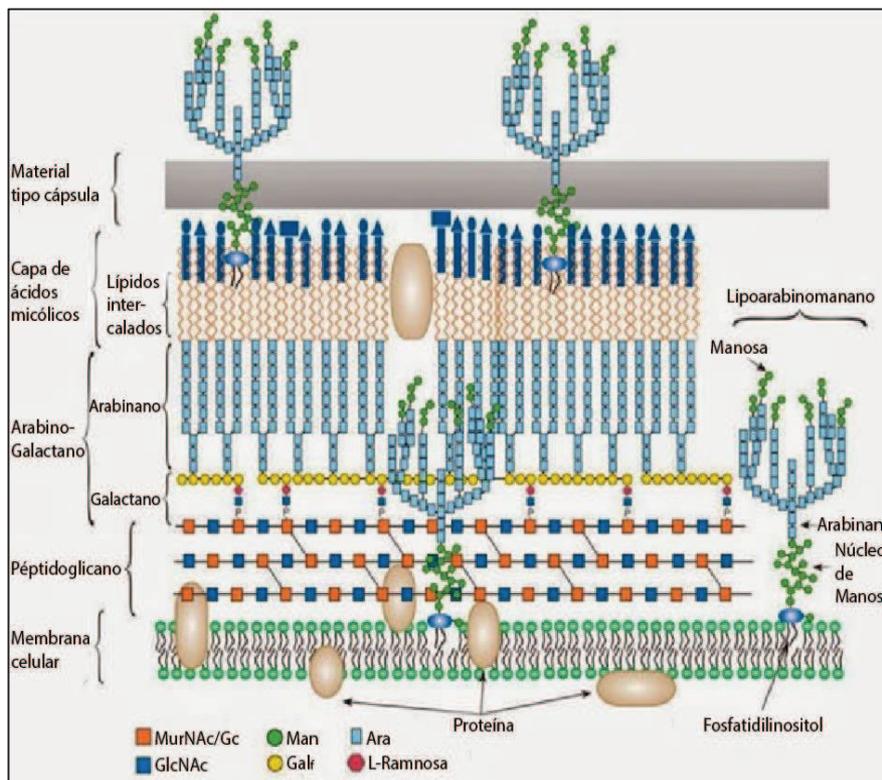


Fig. 2 Representación esquemática de la pared bacteriana de *M. tuberculosis* y sus componentes. Las micobacterias están cubiertas por un complejo formado por ácidos micólicos, arabinogalactano, péptidoglicanos y una cápsula rica en polisacáridos de arabinomanano y manano. MurNAc/Gc: ácido N-acetilmurámico/glucosamina. Man: manosa. Ara: arabinosa. GlcNAc: N-acetilglucosamina. Galr: 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).

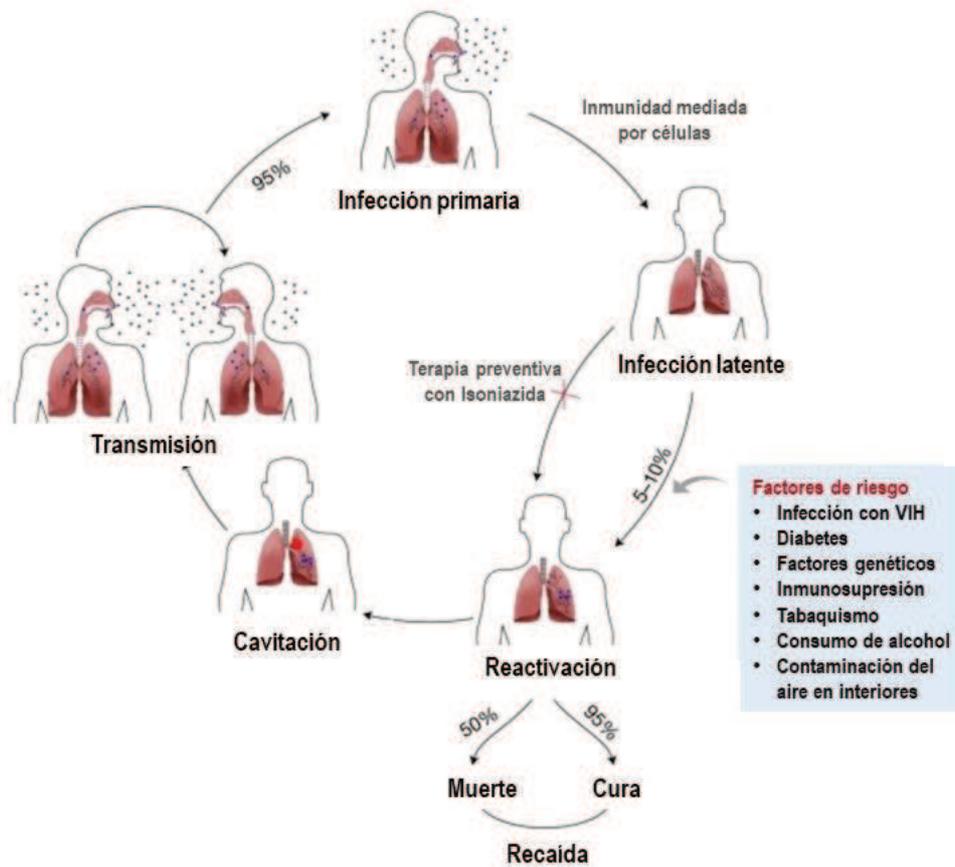


Fig. 3 Transmisión y progresión de la Tuberculosis en humanos. Datos basados en estudios clínicos-epidemiológicos. (Adaptado de *Expert Reviews in Molecular Medicine* © 2011. Cambridge University Press).

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).

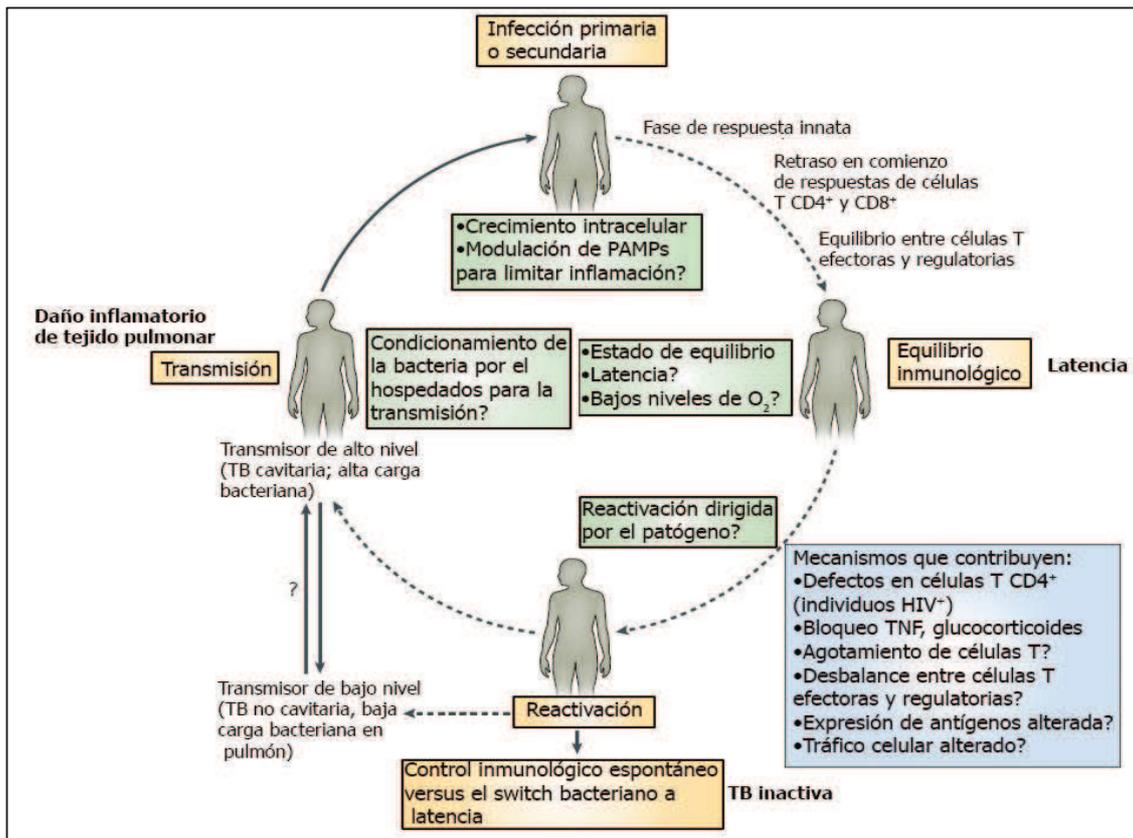


Fig. 4 Estadios en el ciclo de vida inmunológico de la Tuberculosis. La estructura para el ciclo de vida está basada en estudios clínicos, epidemiológicos e inmunológicos en humanos. Se incluyen ejemplos de algunos mecanismos inmunológicos y funciones que caracterizan a cada estadio, en los casos que 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.

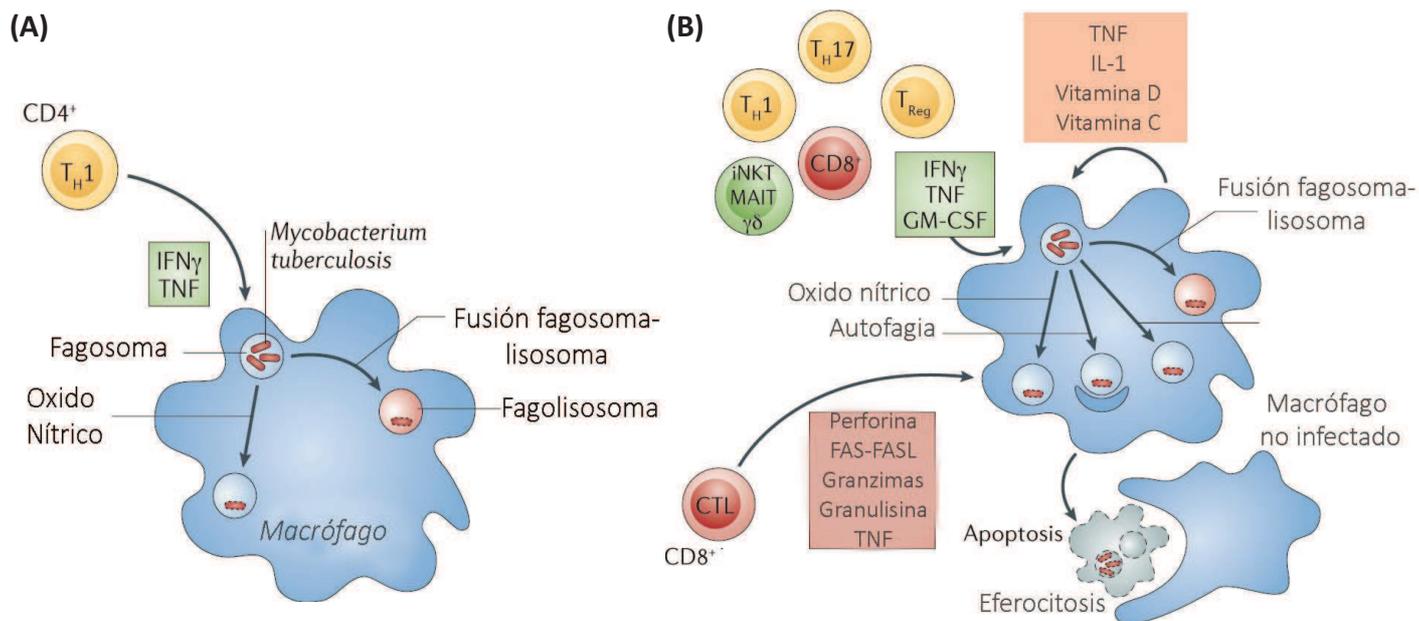


Fig. 5 A) El dogma central de la inmunidad protectora frente a la Tuberculosis. Las células T CD4 producen IFN- γ (células Th1), el cual actúa de manera sinérgica con el TNF- α (producido por macrófagos y células T), y activan la capacidad microbicida de los macrófagos. Los macrófagos son entonces capaces de restringir el crecimiento de *M. tuberculosis*: 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 granulinsina, 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, los 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.

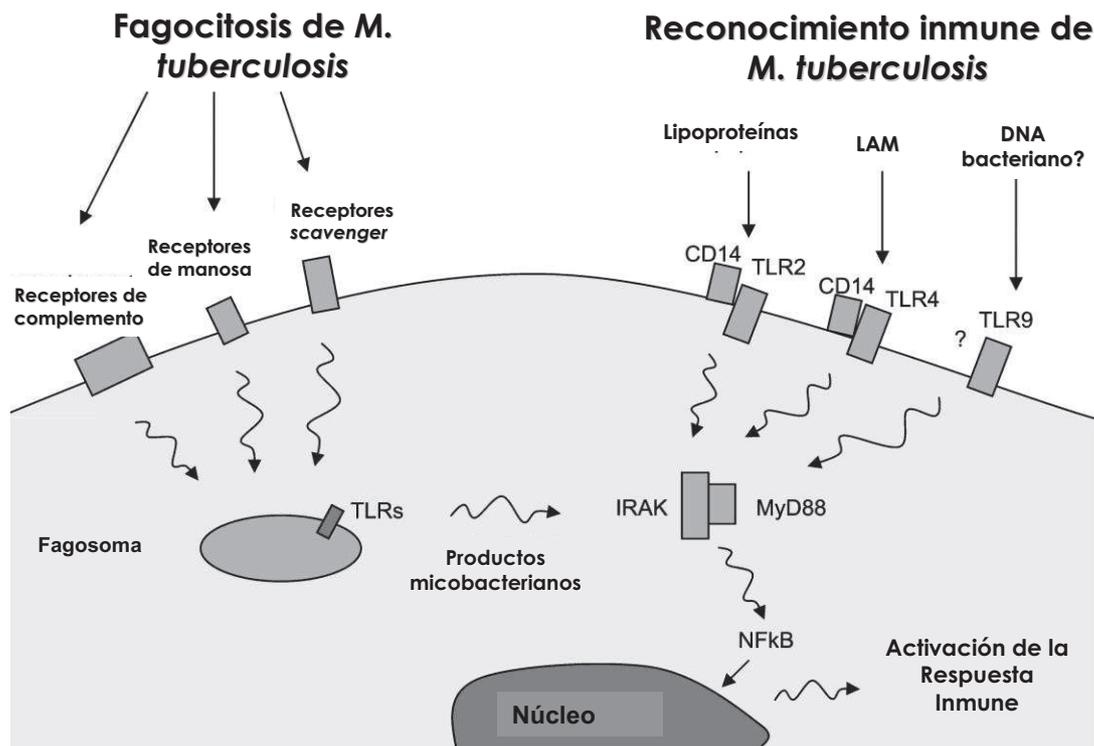


Fig. 6 Fagocitosis y reconocimiento de *M. tuberculosis*. Algunos de los receptores identificados para el reconocimiento de *M. tuberculosis* por macrófagos y CDs (los receptores del complemento, el receptor de manosa, receptores scavenger, el receptor DC-SIGN, el receptor de la proteína surfactante 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 adaptativa¹⁴. 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 infección¹⁴. 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 ≈ 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.

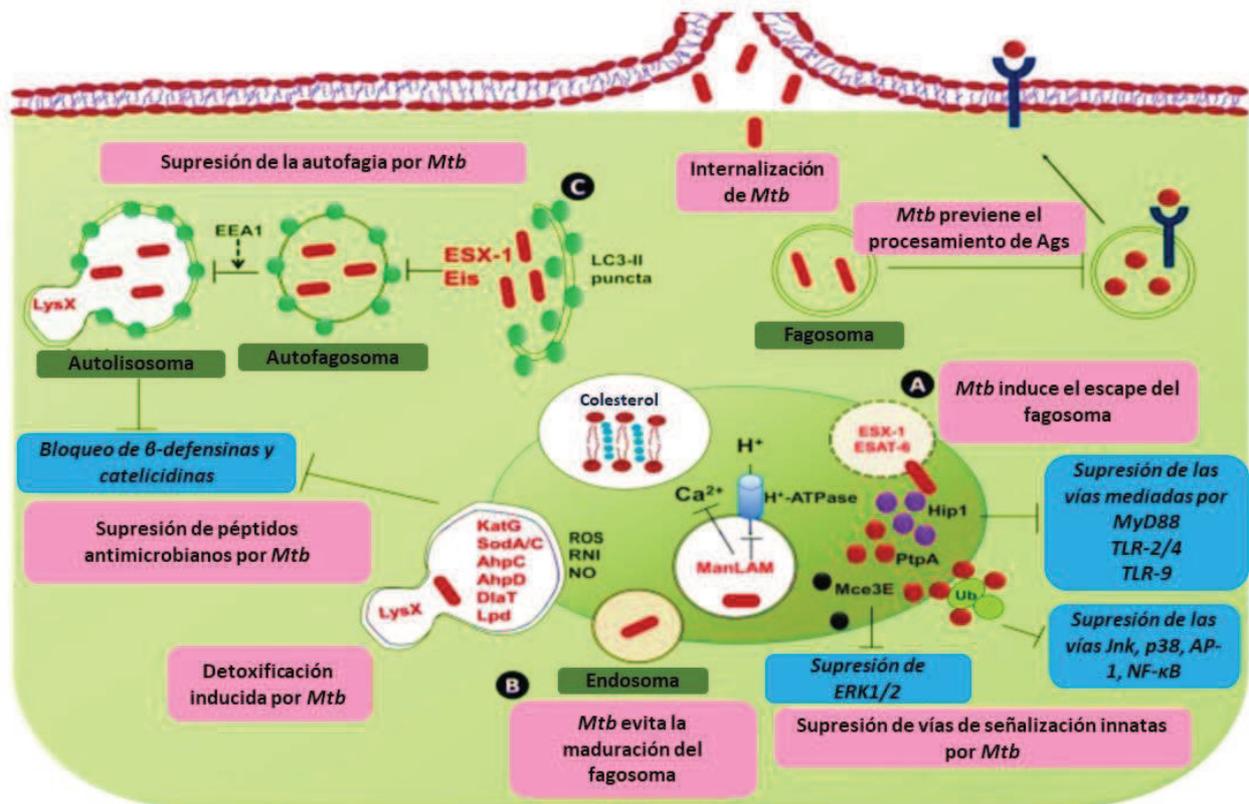


Fig. 7. Estrategias de evasión intracelular adoptadas por *M. tuberculosis* (*Mtb*) y mecanismos de defensa celular. La fagocitosis de *Mtb* es promovida por diversos receptores de superficie celular y el colesterol presentes en las células fagocíticas mononucleares. *Mtb* utiliza el colesterol del hospedador 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 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 coestimuladoras

Las moléculas coestimuladoras 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.

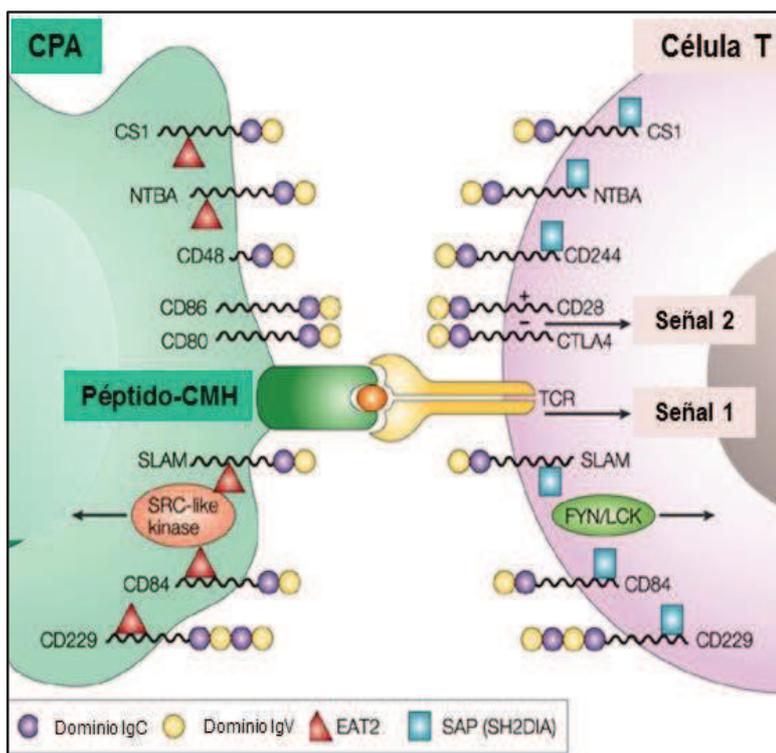


Fig. 8. Modelo de interacción entre miembros de la familia SLAM. Receptores de la familia de SLAM y sus respectivos ligandos durante la presentación antigénica. SLAMF1 (SLAM), SLAMF5 (CD84) y SLAMF7 (CS1) se unen de forma homotípica, mientras que SAMF4 (2B4) se une a SLAMF2 (CD48) así como a CD2, aunque 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 (COENOB). 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.).

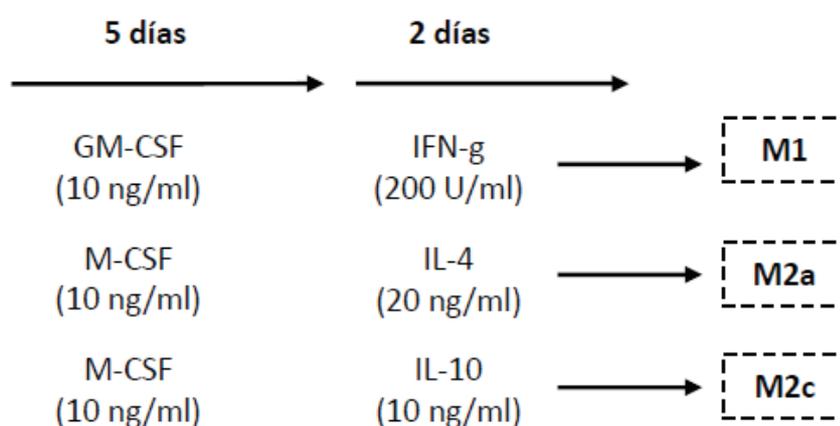
Para obtener macrófagos derivados de monocitos, los monocitos se purificaron a partir de CMSP de dadores sanos mediante selección magnética positiva por CD14 (Miltenyi Biotec, Cat No. 130-097-052), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los casos, la pureza de las células aisladas 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.



Infección 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).

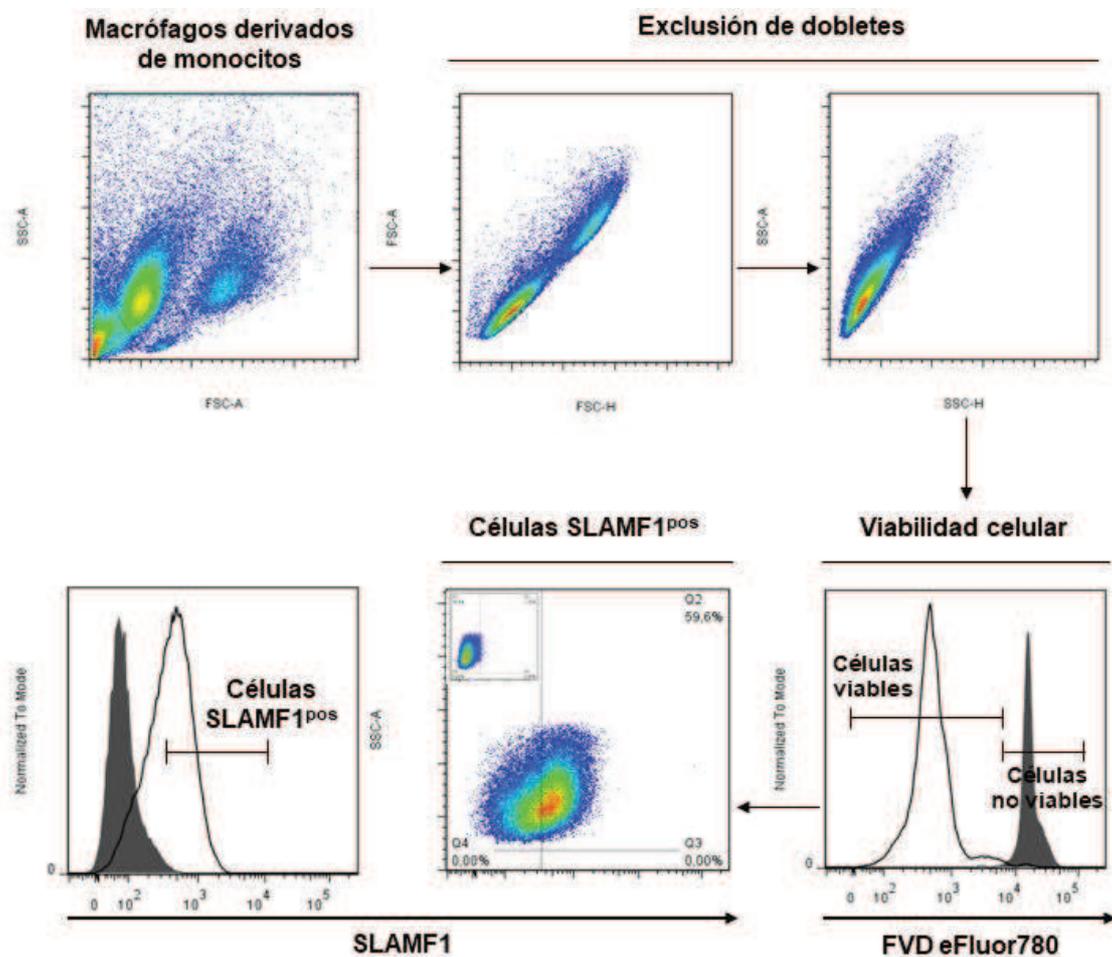


Fig. 1 Estrategia de regiones para el análisis de SLAMF1 por citometría de flujo. Después de seleccionar la población de interés (SSC-A vs. FSC-A), las células se seleccionaron para excluir los dobletes mediante una estrategia de doble singuletes (FSC-A vs. FSC-H y SSC-A vs. SSC-H). Posteriormente, las 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 donadores 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.

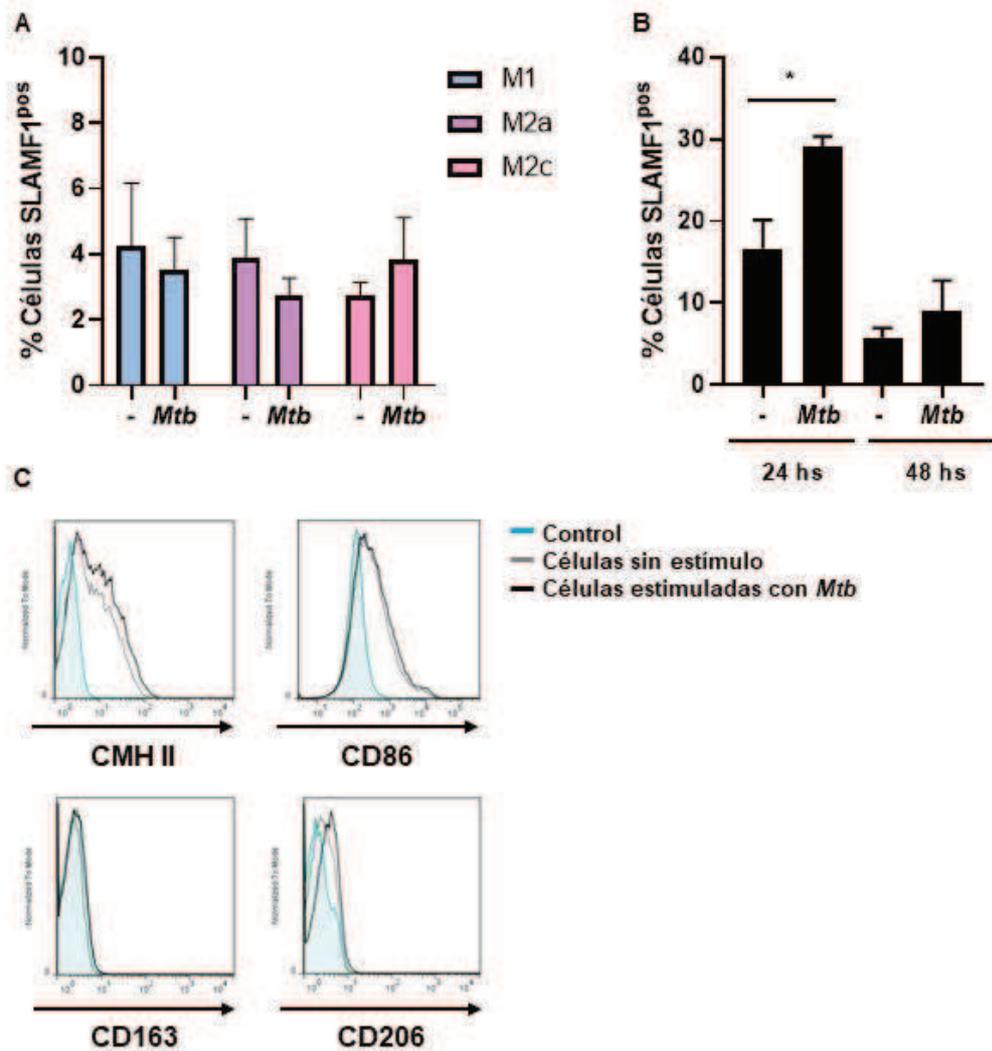


Fig. 1. Elección del modelo de estudio. Los monocitos CD14 positivos se obtuvieron de sangre periférica de donadores sanos mediante selección magnética positiva. **(A)** Se permitió que las células se diferenciaron durante 5 días con M-CSF para M2 o GM-CSF para M1 (10 ng/ml cada una). La polarización 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 dadores 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 dadores 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*.

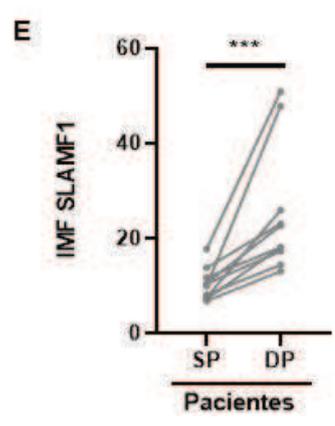
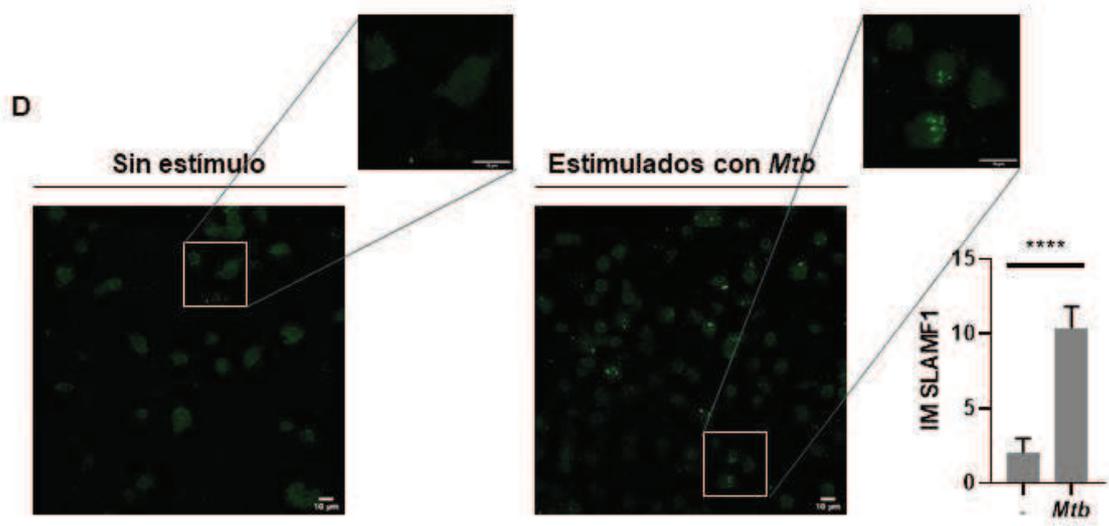
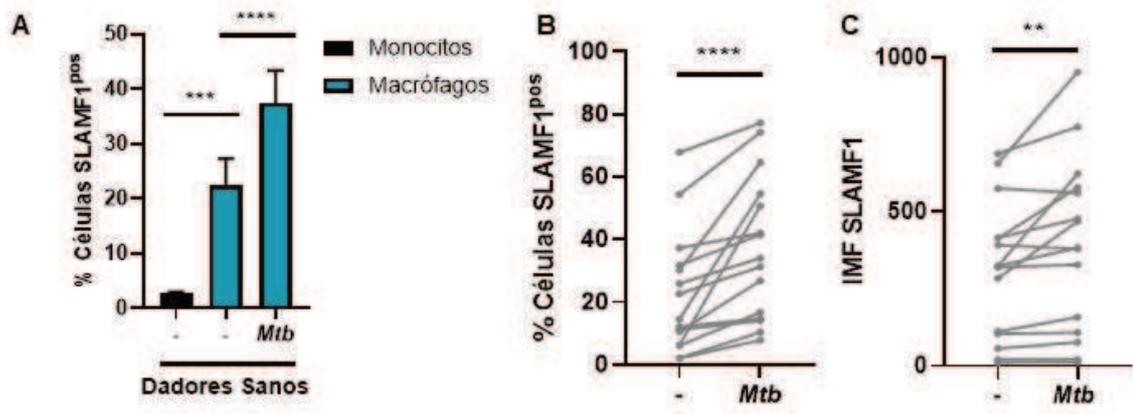


Fig. 2 Expresión de SLAMF1 en monocitos y macrófagos humanos. (A-C) Los monocitos CD14 positivos se obtuvieron a partir de sangre periférica de donadores sanos mediante selección magnética positiva. Después de la adherencia e incubación en medio completo durante 16-18 horas, los macrófagos se estimularon 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 micrografías 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 macrófagos ⁸⁵. 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**).

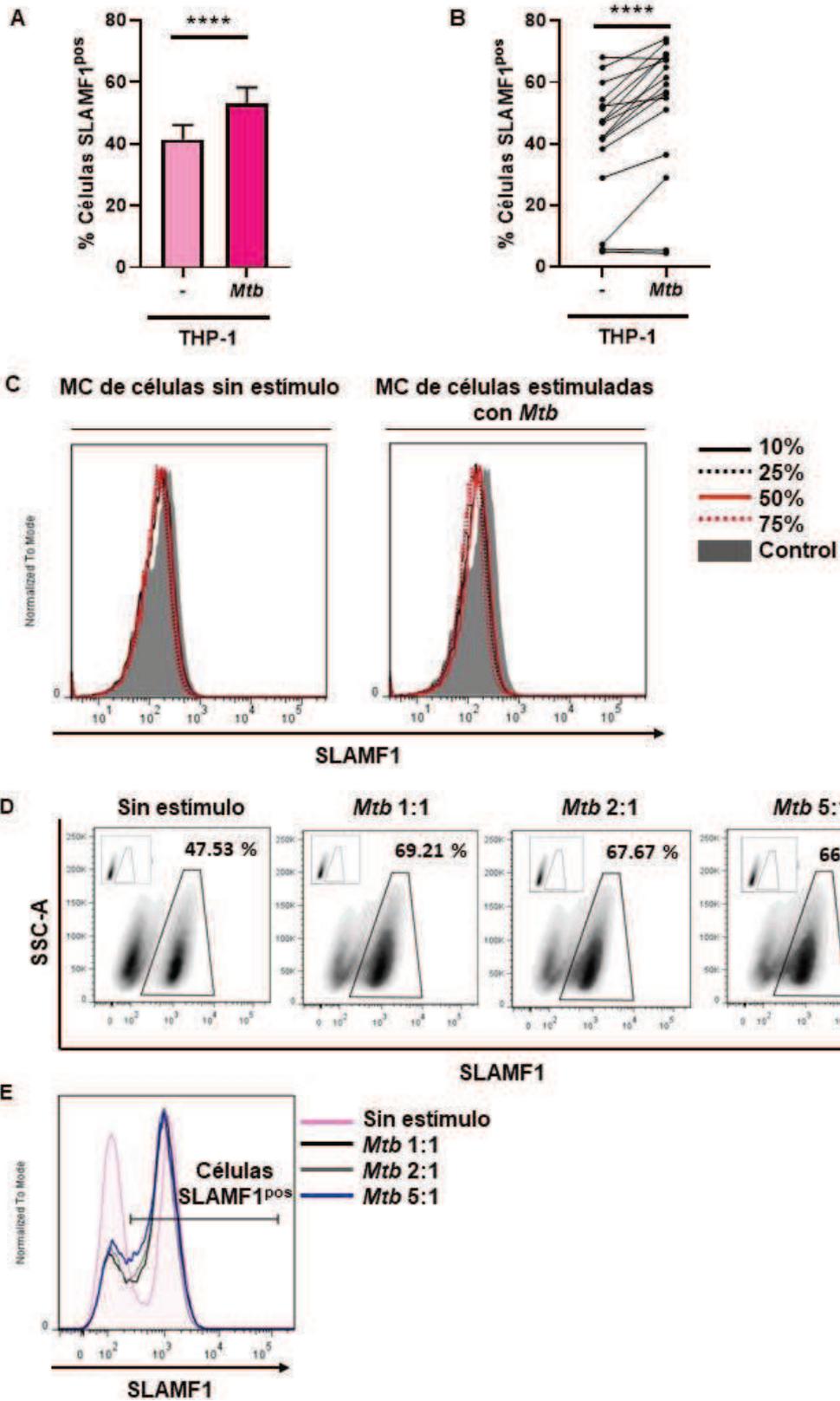


Fig. 3 Expresión de SLAMF1 en células THP-1. (A) Se estimularon células THP-1 diferenciadas con PMA con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) durante 24 horas y se determinó la expresión de SLAMF1 mediante citometría de flujo. (B) Se muestran los valores individuales de SLAMF1 para células THP-1 no 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-g 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.

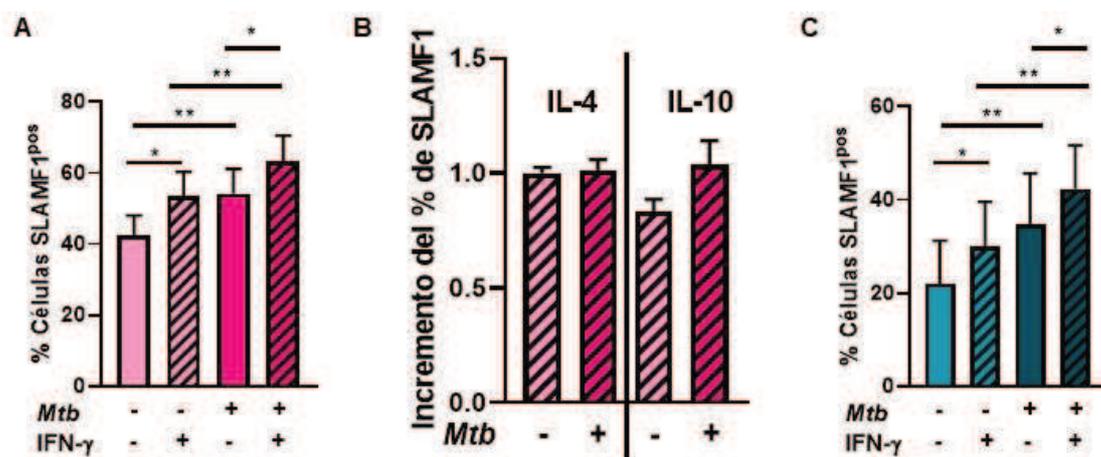


Fig. 4 Efecto de las citoquinas sobre la expresión de SLAMF1. Células THP-1 diferenciadas con PMA se estimularon con o sin el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) en presencia o ausencia de rhIFN- γ (A), rhIL-4 o rhIL-10 (B) y se determinó la expresión de SLAMF1 mediante citometría de flujo. (C) Se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

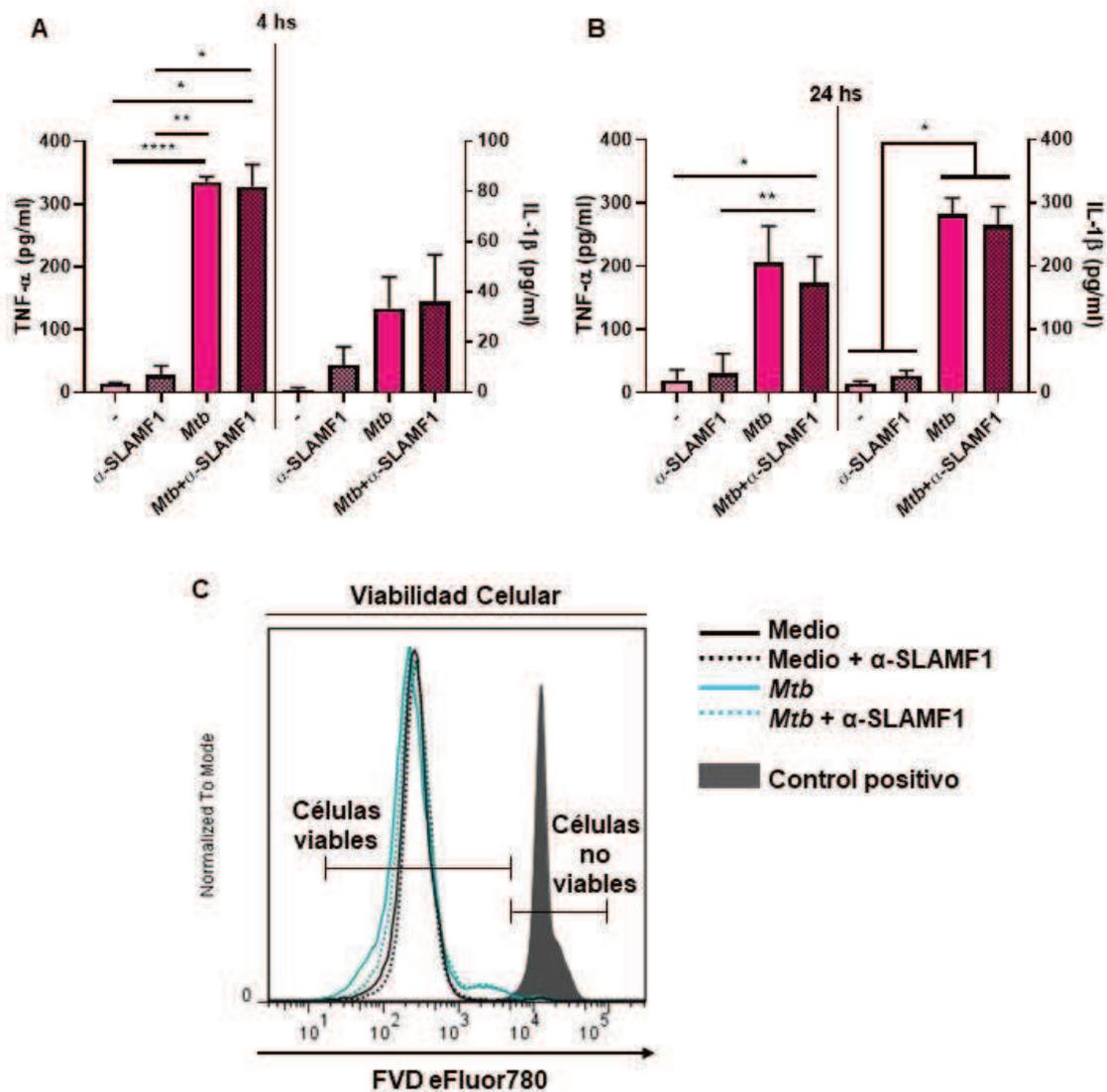


Fig. 5 Efecto de la coestimulación a través de SLAMF1 sobre la producción de citoquinas frente a *M. tuberculosis*. Se estimularon células THP-1 diferenciadas con PMA con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) durante 4 (A) o 24 (B) horas en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista para SLAMF1 (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.

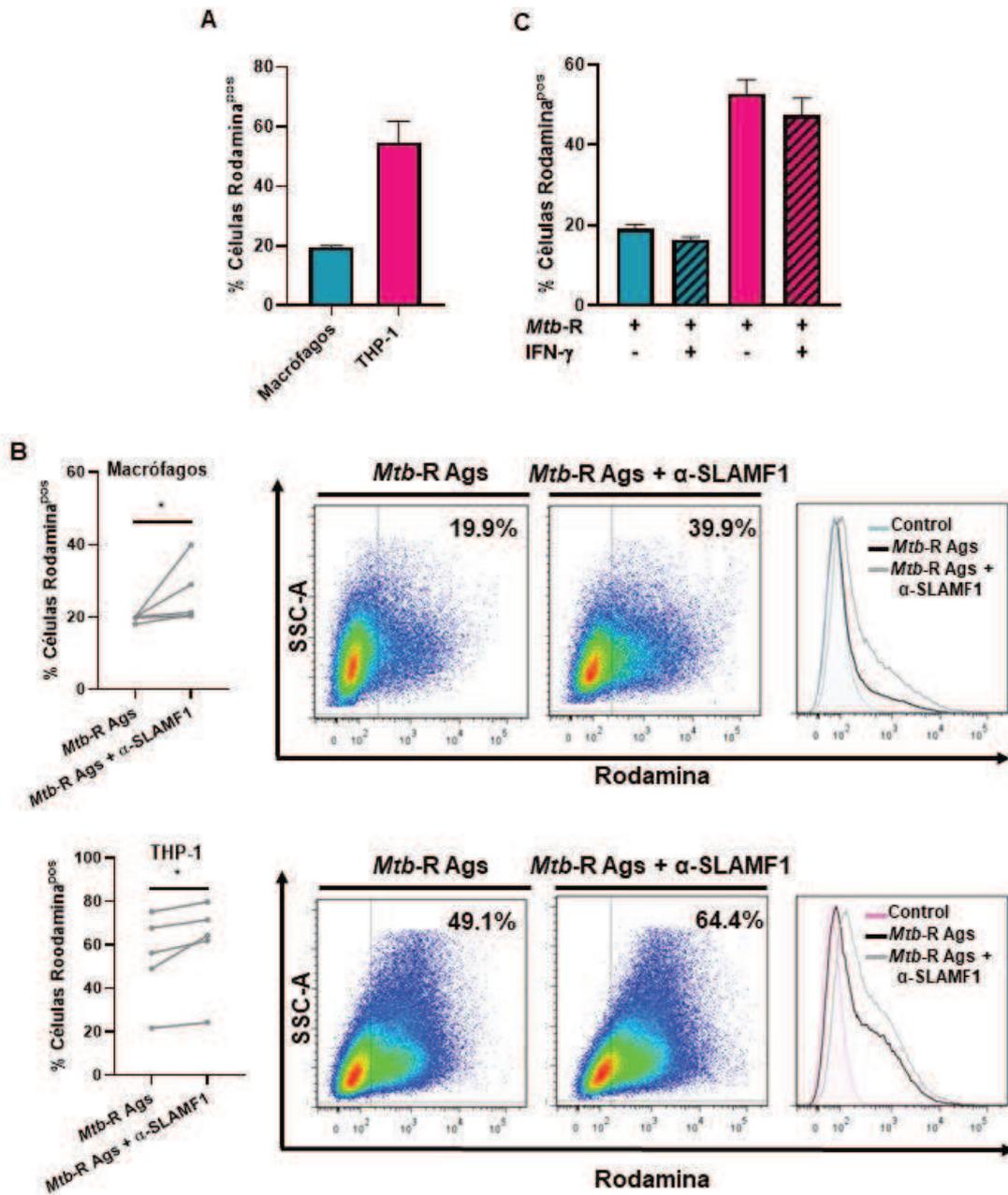


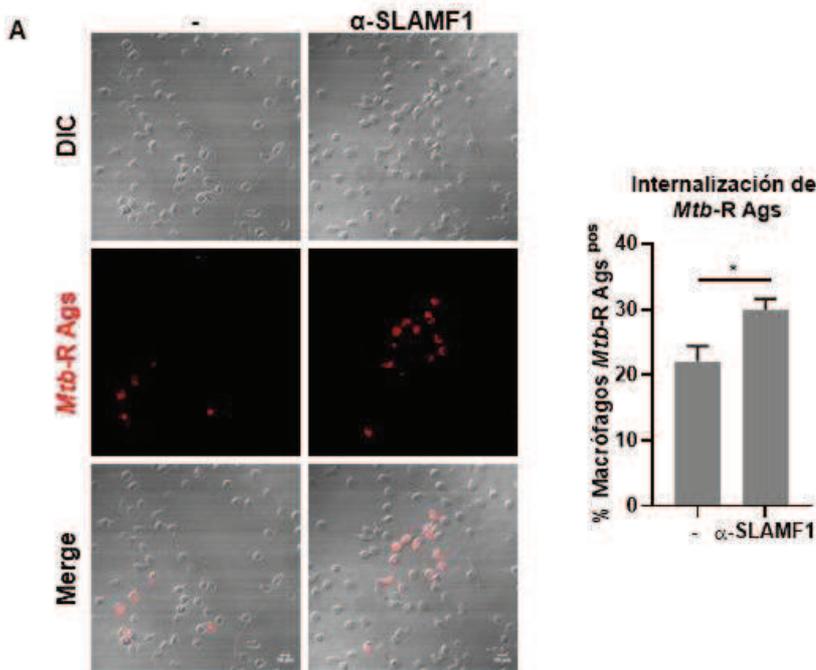
Fig. 6 Rol de SLAMF1 en la interacción macrófagos-*M. tuberculosis*. (A) Los macrófagos de donadores sanos y las células THP-1 diferenciadas con PMA se estimularon con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb-R Ags*) por 24 horas. Se muestran los porcentajes de células de rodamina positivas 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.



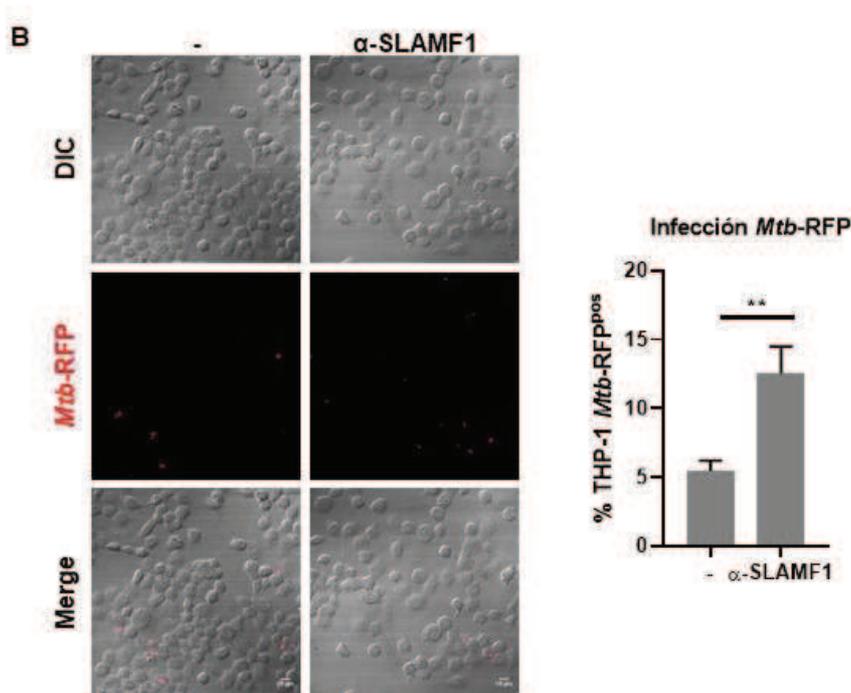


Fig. 7 Rol de SLAMF1 en la interacción de las células humanas con *M. tuberculosis*. (A) Los macrófagos de donadores sanos se estimularon con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb*-R Ags) en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista α -SLAMF1 por 24 horas. Se evaluó la internalización 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.

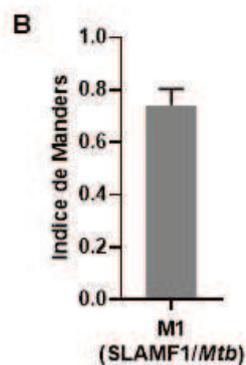
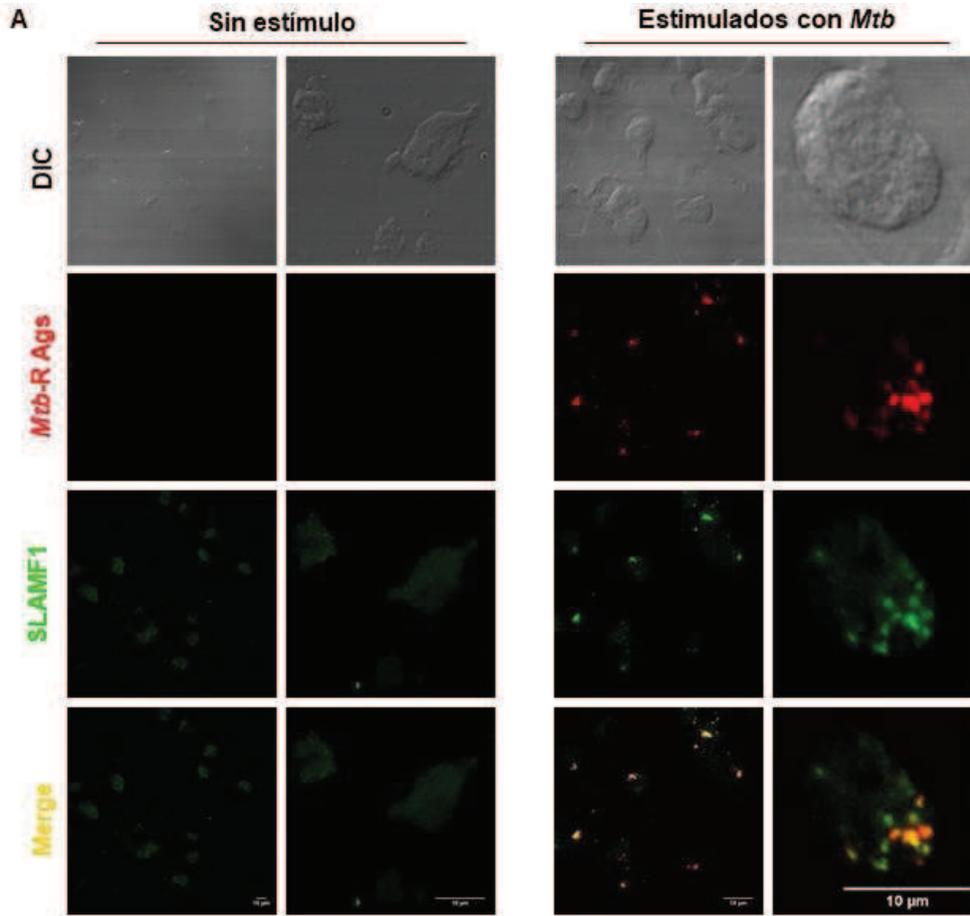


Fig. 8 Colocalización SLAMF1-*M. tuberculosis*. (A) Los macrófagos provenientes de dadores sanos se estimularon durante 24 horas con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb*-R Ags). Para la detección de SLAMF1 se utilizó un anticuerpo específico de ratón anti-SLAMF1 humano seguido 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.

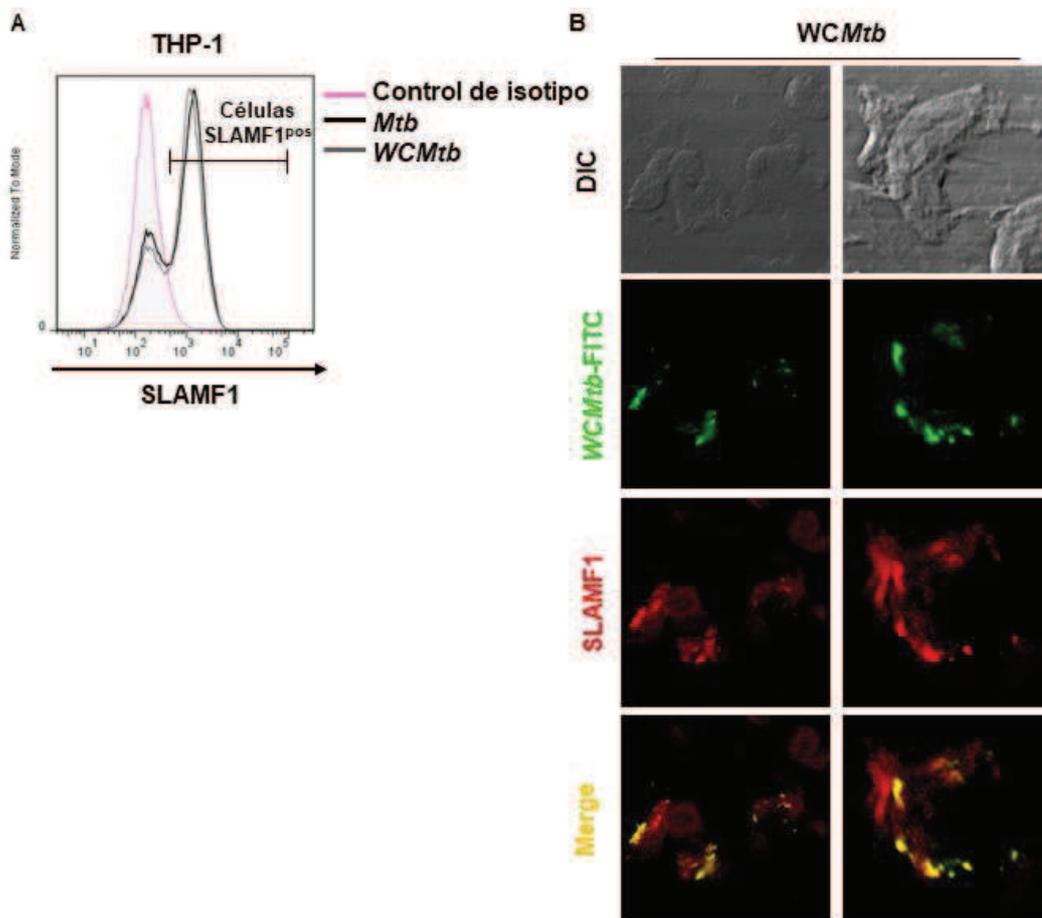


Fig. 9 Colocalización de SLAMF1 con células enteras de *M. tuberculosis*. (A) Células THP-1 diferenciadas con PMA se estimularon con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) o células enteras de *M. tuberculosis* (*WCMtb*) durante 24 horas y la expresión de SLAMF1 se determinó por citometría de flujo. 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**).

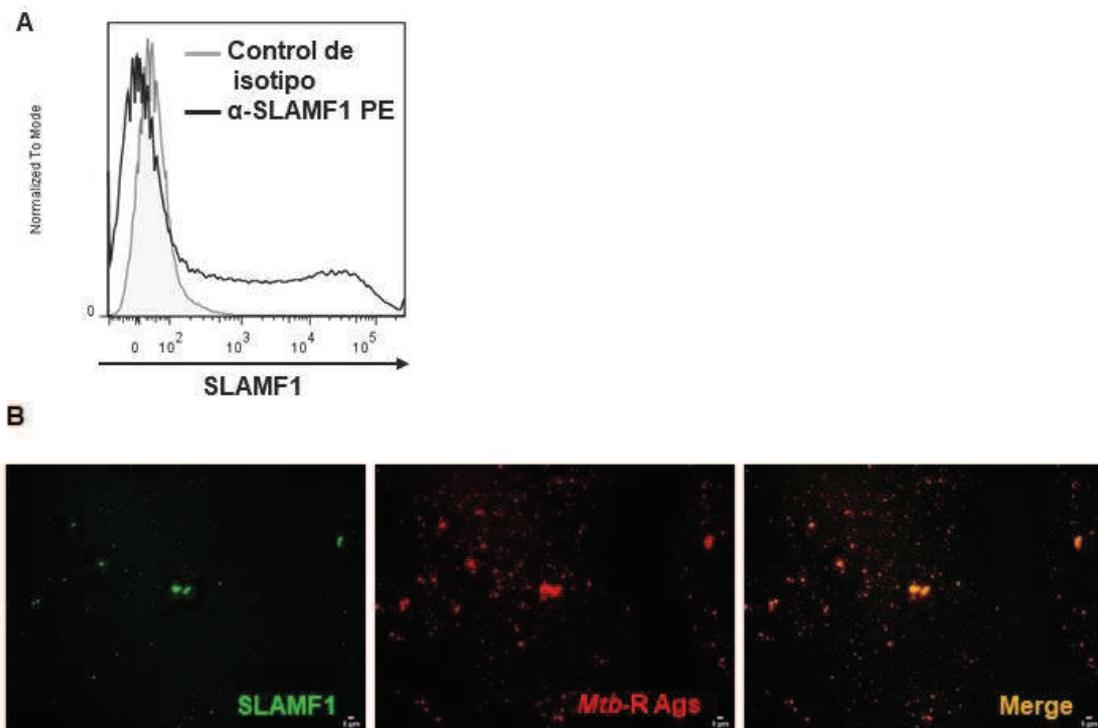


Fig. 10 Interacción de SLAMF1 con *M. tuberculosis*. Macrófagos derivados de monocitos de dadores sanos se estimularon con el sonicated *M. tuberculosis* durante 24 horas para inducir la expresión de SLAMF1 y se prepararon extractos de proteínas celulares totales en condiciones no desnaturizantes. **(A)** 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: $1 \mu\text{m}$

Tabla 2	Canal Verde	Canal Rojo
<i>Mtb</i> -R Ags	-	+
<i>Mtb</i> -R Ags + extracto de proteínas de macrófagos	-	+
<i>Mtb</i> -R Ags + anti-ratón Alexa Fluor 488 (control de pegado inespecífico del anticuerpo secundario)	-	+
<i>Mtb</i> -R Ags + 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</i> -R Ags + 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 sonicated 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.

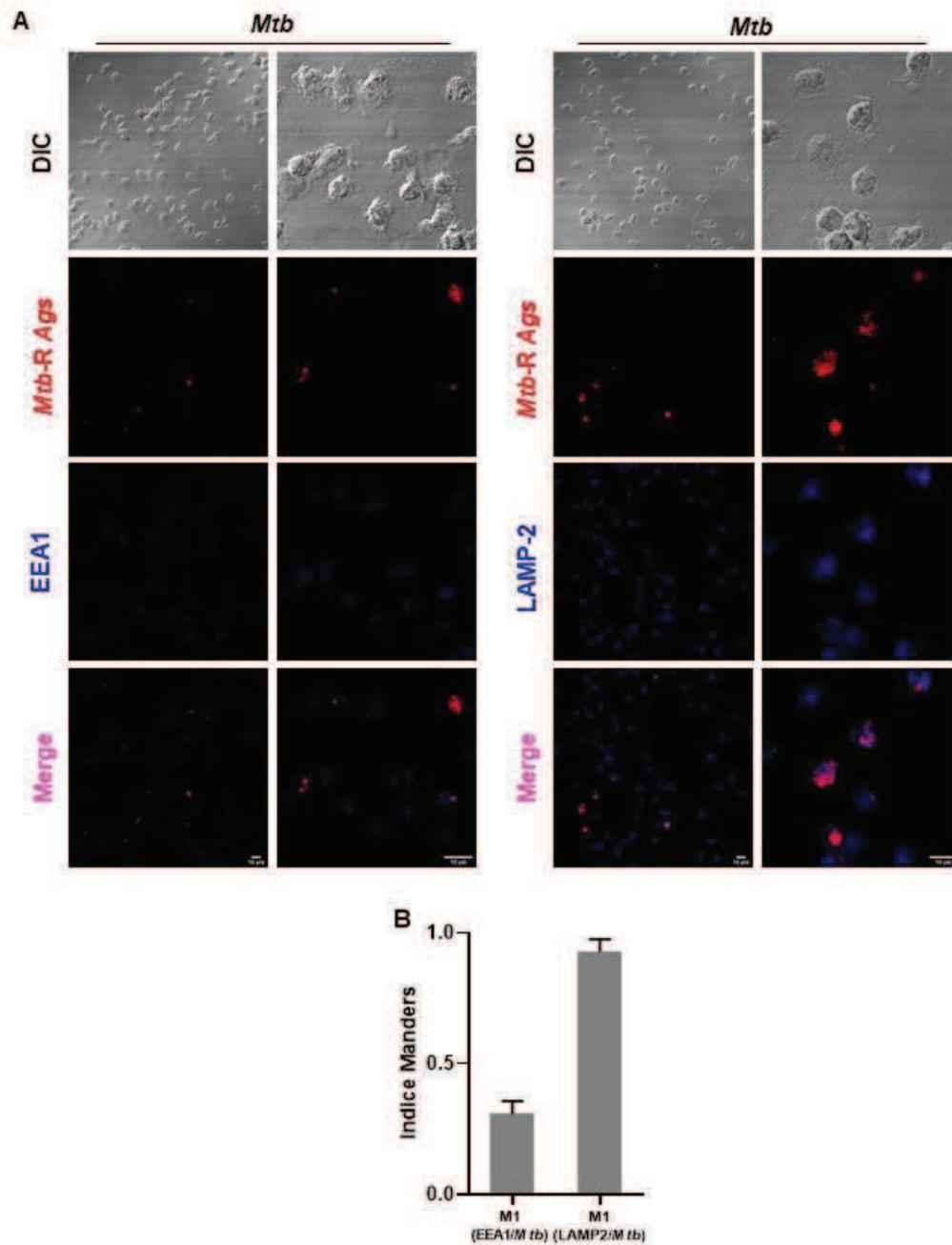
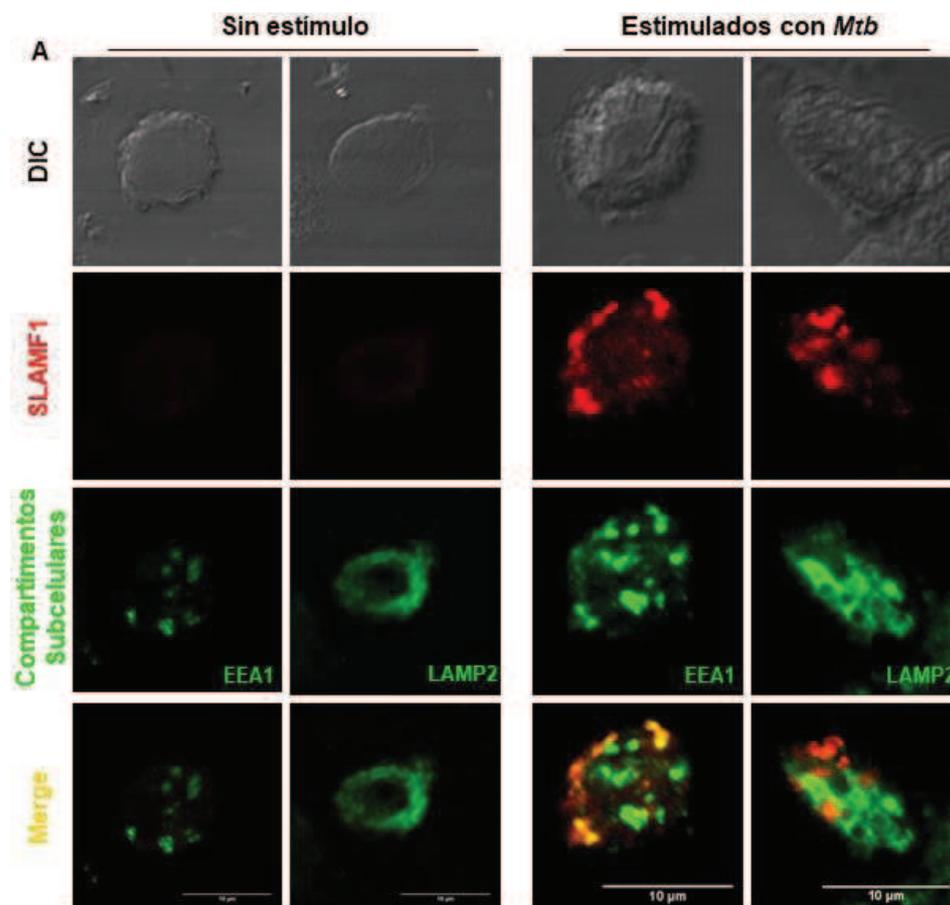


Fig. 11 Ruta de *M. tuberculosis* a través de la vía endosomal. (A) Macrófagos de dadores sanos se estimularon durante 24 horas con el sonicado de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (Mtb-R Ags) y la localización subcelular se determinó por microscopía confocal utilizando anticuerpos específicos de 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 colocación 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.



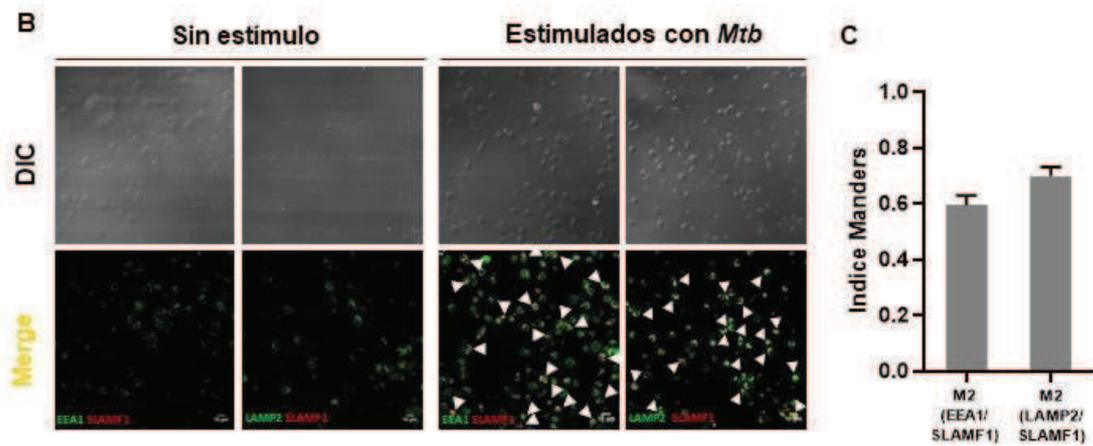


Fig. 12 Colocalización de SLAMF1 con compartimentos endosomales. Macrófagos de donadores sanos se estimularon durante 24 horas con el sonicado de *M. tuberculosis* (*Mtb*) sin teñir. La expresión de EEA1, LAMP2 y SLAMF1 se detectó utilizando anticuerpos específicos para estas moléculas seguidos por un 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 descripto 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 donores 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 antimicobacteriana 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 relocó 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 murina¹⁰⁷. 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 humana¹⁰⁷. 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 humanos¹⁰⁸⁻¹¹². 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 LPS¹¹⁵, 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 CD40L¹¹⁶. 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 NO⁶⁶, mientras que la estimulación con LPS en macrófagos deficientes para SLAMF1 aumentó la producción de IL-6⁶⁶. 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-6 ⁸². 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 extrema 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 microscopía 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 CD4 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 *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

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.

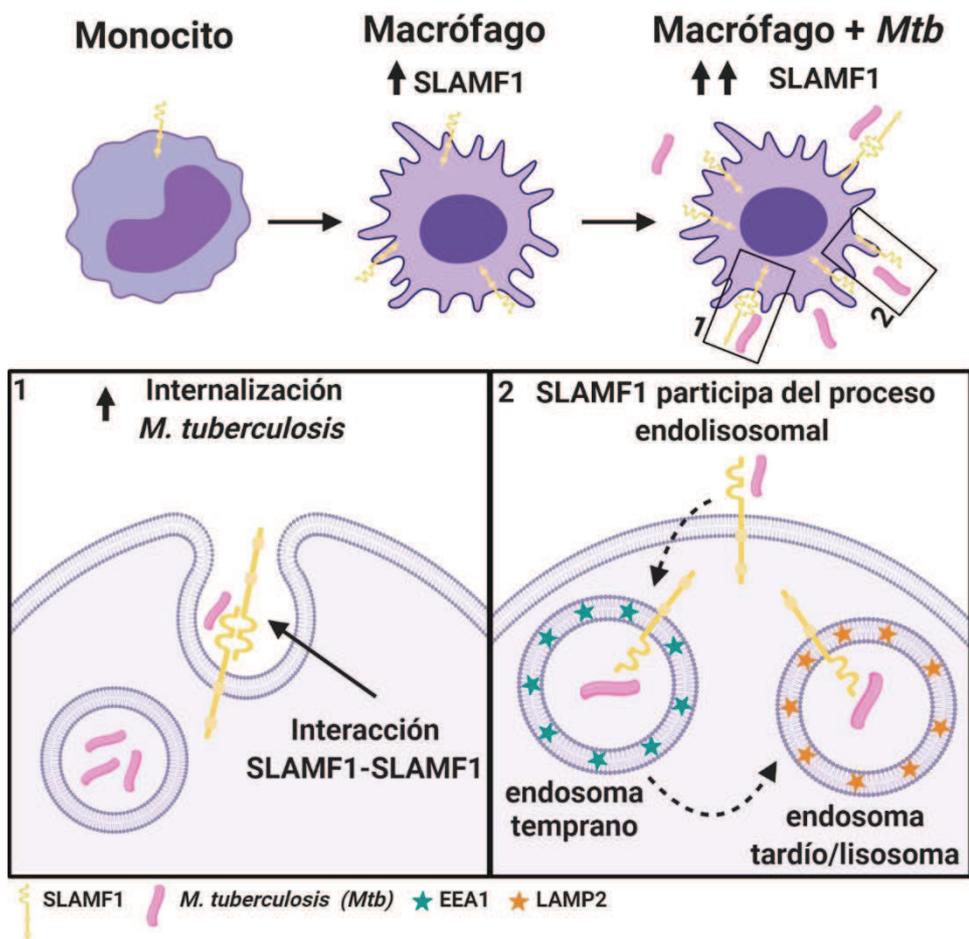


Figura 1. Modulación y rol de SLAMF1 como sensor microbiológico y regulador de la internalización de *M. tuberculosis* en macrófagos. (Adaptado de: Barbero AM et al. SLAMF1 signaling induces Mycobacterium tuberculosis uptake leading to endolysosomal maturation in human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2020;1–17.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

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 toxigenic 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, Desse 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.