

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

PEDECIBA Biología

TESIS DE MAESTRÍA

Opción Biología Celular y Molecular

**“Contribución a la caracterización de las moléculas inmunorreguladoras
TORID-1 y TORID-2”**

Lic. Florencia Rammauro

Orientador: MD, PhD. Marcelo Hill

Co-orientador: PhD. Leticia Zarantonelli

Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación. Institut Pasteur de Montevideo.

Departamento de Inmunobiología. Facultad de Medicina. Universidad de la
República.

Noviembre 2018

AGRADECIMIENTOS

A Marcelo, por recibirme en el laboratorio cuando recién estaba empezando y todo lo aprendido a lo largo de estos casi 4 años.

A Leticia, por su rol como co-orientadora e introducirme al mundo de las leptospiras.

A Analía Rial, Carlos Escande y Carlos Robello por aceptar formar parte del tribunal de esta Tesis de Maestría.

Al resto del LIRI: Sofí, Mai, Mathi, Ale, Vale, y Mercedes. Ha sido un gusto compartir la vida de laboratorio (y fuera de) con ustedes, gracias por el apoyo siempre y hacer todo mucho más divertido.

A todos los miembros de la UPR: Daniel, Noé, Clau, Ceci, Sandra, Angimar, Colo y Pablo M, por toda la ayuda experimental y el aguante espiritual. Gracias en especial a Daniel Prieto por las horas y horas de microscopio y a Angimar Uriepero, fue un placer trabajar contigo este último tiempo.

A los compañeros del Dpto. de Inmunobiología por estar siempre presentes para conversar de ciencias y otras cosas.

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología Estructural del Institut Pasteur y la unidad Mixta INIA-Institut Pasteur por su ayuda en las cuestiones de biología molecular y de las leptospiras, en especial a Ceci Nieves.

A los integrantes de la Plataforma de Citometría de Flujo del Institut Pasteur, en especial a Sabina Victoria, por el entrenamiento en el uso de los citómetros y las horas de sorting.

A los integrantes de la Plataforma de Microscopía del Institut Pasteur, en especial a Marcela Díaz y Tabaré de los Campos.

A los integrantes de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, en especial a Gabriel Fernández y Ana Paula Arévalo, por toda la ayuda con los ratones.

Al resto de los miembros del Institut Pasteur que de una u otra forma siempre están colaborando para que las cosas salgan adelante.

A Mathieu Picardeau, por recibirme en su laboratorio y la ayuda brindada para que las leptospiras OVA sean una realidad. Y al resto de los integrantes de la Unidad de biología de Espiroquetas del Institut Pasteur, gracias a todos por recibirme en París y hacerme sentir como el casa.

A mis amigos por estar ahí siempre y darme para adelante, en las buenas y en las malas.

A Juan, por bancarme en este último tiempo, que ha sido de todo menos tranquilo.

Y por último, agradecerles infinito a mis padres, que cada uno desde su lugar siempre me han dado su apoyo incondicional y han creído en mí, sin ustedes no hubiera sido posible.

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATURAS | 8 |
| RESUMEN | 13 |
| CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL | 14 |
| 1.1. Regulación de la respuesta inmune | 14 |
| 1.2. Tolerancia central y periférica | 17 |
| 1.3. Células dendríticas en inmunoregulación | 20 |
| 1.4. Respuesta inflamatoria | 26 |
| 1.5. Los inflamasomas | 29 |
| 1.6. Muerte celular por piroptosis | 33 |
| 1.7. TMEM176A y TMEM176B | 36 |
| OBJETIVOS GENERALES | 43 |
| CAPÍTULO II: TMEM176A regula la activación del inflammasoma y la muerte celular por piroptosis en la Leucemia Linfoide Crónica progresiva | 45 |
| 2.1. Introducción | 45 |
| 2.1.1. Mecanismos tumorales de inmunoregulación | 45 |
| 2.1.2. Leucemia Linfoide Crónica | 50 |
| 2.2. Objetivos específicos | 57 |
| 2.3. Materiales y métodos | 58 |
| 2.3.1. Muestras humanas | 58 |
| 2.3.2. Western Blot anti-TMEM176A de lisados de PBMCs de pacientes con LLC | 58 |
| 2.3.3. Western Blot anti-GAPDH | 59 |
| 2.3.4. Inmunofluorescencia anti-TMEM176A en PBMCs de LLC | 59 |
| 2.3.5. Purificación a partir de PBMCs de células CD19+ por separación celular activada por magnetismo (MACS) | 60 |
| 2.3.6. Evaluación de caspasa-1 activa y viabilidad celular mediante citometría de | 60 |

| | |
|--|-----------|
| flujo | |
| 2.3.7. Marcado de inmunofluorescencia de Caspasa-1 activa en PBMCs de LLC | 61 |
| 2.3.8. Western Blot anti-GSDMD | 61 |
| 2.3.9. Cultivo de PBMCs de pacientes con LLC | 62 |
| 2.3.10. Evaluación de la muerte celular espontánea de células B de LLC en cultivo | 62 |
| 2.3.11. Inhibición de caspasa-1 en PBMCs de LLC | 63 |
| 2.3.12. Silenciamiento de TMEM176A en PBMCs | 63 |
| 2.3.13. Evaluación de la muerte celular inducida por el (+)-BayK8644 sobre células B de LLC | 64 |
| 2.3.14. Evaluación de la muerte celular inducida por el tratamiento combinado de (+)-BayK8644 y Venetoclax sobre células B de LLC | 64 |
| 2.4. Resultados | 65 |
| 2.4.1. Expresión de TMEM176A en células B de LLC | 65 |
| 2.4.2. Activación de Caspasa-1 en células B de pacientes con LLC | 68 |
| 2.4.3. Clivado de Gasdermina D en células B de LLC | 70 |
| 2.4.4. Muerte de PBMCs de LLC en cultivo por piroptosis | 71 |
| 2.4.5. Silenciamiento de TMEM176A en PBMCs de LLC | 74 |
| 2.4.6. Efecto del silenciamiento de TMEM176A sobre la activación de caspasa-1 en células B de LLC | 76 |
| 2.4.7. Correlación entre la expresión de TMEM176A y el clivado de GSDMD en PBMCs de LLC | 79 |
| 2.4.8. Inhibición farmacológica de TMEM176A en células de LLC y muerte por piroptosis | 80 |
| 2.4.9. Efecto combinado de +(-)BayK8644 y Venetoclax en la muerte de células de LLC | 82 |
| 2.5. Discusión | 85 |
| CAPÍTULO III: Respuesta adaptativa de células T frente a <i>Leptospira</i> y rol de Tmem176b en un modelo murino de infección | 98 |
| 3.1. Introducción | 98 |
| 3.1.1. Estrategias de inmunoevasión utilizadas por las bacterias | 98 |
| 3.1.2. Leptospirosis y respuesta inmune | 103 |

| | |
|---|------------|
| 3.2. Objetivos específicos | 113 |
| 3.3. Materiales y métodos | 114 |
| 3.3.1. Oligos utilizados | 114 |
| 3.3.2. Generación del vector de expresión pMaORI-OVA-GFP | 114 |
| 3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 116 |
| 3.3.4. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de ADN a partir del gel | 117 |
| 3.3.5. Preparación de bacterias competentes <i>E. coli</i> π 1 y β 2163 para transformación | 117 |
| 3.3.6. Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico | 118 |
| 3.3.7. Purificación de ADN plasmídico | 118 |
| 3.3.8. Digestión con enzimas de restricción | 118 |
| 3.3.9. Secuenciación del plásmido pMaORI-OVA-GFP | 119 |
| 3.3.10. Transformación de <i>Leptospira</i> spp por conjugación con <i>E. coli</i> β 2163 | 119 |
| 3.3.11. Extracción de ADN de <i>Leptospira</i> spp | 120 |
| 3.3.12. Amplificación del plásmido pMaORI-OVA-GFP a partir de ADN de <i>Leptospira</i> spp | 120 |
| 3.3.13. Wester Blot anti-GFP | 121 |
| 3.3.14. Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) | 122 |
| 3.3.15. Ensayos de proliferación de células OT-II | 122 |
| 3.3.16. ELISA IFN- γ e IL-10 | 124 |
| 3.3.17. Maduración de BMDCs en respuesta a <i>Leptospira</i> spp | 124 |
| 3.3.18. Medida del pH fagolisosomal | 124 |
| 3.3.19. Infección con <i>L. interrogans</i> | 126 |
| 3.3.20. Estudios histológicos | 127 |
| 3.4. Resultados | 130 |
| 3.4.1. Construcción del vector pMaORI-OVA-GFP | 130 |
| 3.4.2. Transformación de <i>L. biflexa</i> serovar Patoc I (LBP) y <i>L. interrogans</i> serovar Manilae (LIM) con el plásmido pMaORI-OVA-GFP | 132 |
| 3.4.3. Expresión de la proteína de fusión OVA-GFP en <i>Leptospira</i> spp recombinantes | 134 |
| 3.4.4. Proliferación de células OT-II en respuesta a BMDCs infectadas con <i>Leptospira</i> spp recombinante para OVA | 136 |
| 3.4.5. Producción de IFN- γ e IL-10 | 137 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.6. Maduración de BMDCs por <i>Leptospira</i> spp | 139 |
| 3.4.7. Proliferación de células OT-II en respuesta a BMDCs infectadas con <i>Leptospira</i> spp y péptido OVA | 140 |
| 3.4.8. Medida del pH fagolisosomal de BMDCs infectadas con <i>Leptospira</i> spp | 141 |
| 3.4.9. Infección de ratones con <i>L. interrogans</i> y depleción de células T CD4+ | 143 |
| 3.4.10. Infección de ratones WT y Tmem176b ^{-/-} con <i>L. interrogans</i> | 144 |
| 3.4.11. Producción de IL-1β por BMDCs en respuesta a <i>Leptospira</i> spp | 145 |
| | |
| 3.5. Discusión | 147 |
| | |
| CONCLUSIONES GENERALES | 159 |
| | |
| CAPÍTULO IV: Figuras y tablas suplementarias | 161 |
| | |
| S4.1. Expresión de TMEM176B en PBMCs de pacientes con LLC | 161 |
| S4.2. Análisis de la pureza de células CD19+ obtenidas por MACS a partir de PBMCs de LLC | 161 |
| S4.3. Co-localización de caspasa-1 activa y NLRP3 en células de LLC | 162 |
| S4.4. Determinación de LDH en el sobrenadante de cultivo de células de LLC | 162 |
| S4.5. Efecto de IL-1β recombinante humana sobre PBMCs de pacientes con LLC | 163 |
| S4.6. Expresión de TMEM176A por PBMCs de pacientes con LLC en cultivo | 164 |
| S4.7. Expresión relativa de citoquinas por BMDCs WT y Tmem176b ^{-/-} co-incubadas con <i>Leptospira</i> | 165 |
| S4.8. Fagocitosis de <i>Leptospira</i> por BMDC WT y Tmem176b ^{-/-} | 166 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 167 |

| | |
|---|------------|
| Figura 1.1. Esquema de los mecanismos de tolerancia central y periférica que operan sobre las células T | 17 |
| Figura 1.2. Principales mecanismos de inmunoregulación que utilizan las células dendríticas tolerogénicas | 23 |
| Figura 1.3. Activación de los inflammasomas y piroptosis | 30 |
| Figura 1.4. Estructura de TMEM176A y B | 37 |
| Figura 2.1. Fase de escape de la inmunoección de cáncer | 47 |
| Figura 2.2. Apoptosis y mecanismo de acción del Venetoclax | 54 |
| Figura 2.3. Expresión de TMEM176A en PBMCs de LLC | 66 |
| Figura 2.4. Expresión de TMEM176A en células B de LLC | 67 |
| Figura 2.5. Presencia de caspasa-1 activa en células B de LLC | 69 |
| Figura 2.6. Presencia de gasdermina D en células B de LLC | 71 |
| Figura 2.7. Muerte compatible con piroptosis de células B de LLC en cultivo | 72 |
| Figura 2.8. Muerte de células B de LLC con inhibidor de caspasa-1 | 74 |
| Figura 2.9. Puesta a punto del silenciamiento proteico mediante siRNA en células de LLC | 75 |
| Figura 2.10. Silenciamiento de TMEM176A en PBMCs de LLC | 77 |
| Figura 2.11. Efecto del silenciamiento de TMEM176A en la activación de caspasa-1 en PBMCs de LLC | 78 |
| Figura 2.12. Correlación entre la expresión de TMEM176A y el clivado de GSDMD en PBMCs de LLC | 80 |
| Figura 2.13. Efecto de la inhibición farmacológica de TMEM176A en la muerte por piroptosis de células de LLC | 81 |
| Figura 2.14. Efecto combinado de +(-)BayK8644 y Venetoclax en la muerte de células de LLC | 83 |
| Figura 3.1. Estrategias de evasión de patógenos bacterianos intracelulares | 100 |
| Figura 3.2. Diseño del vector de expresión en <i>Leptospira</i> spp pMaORI-OVA-GFP | 131 |
| Figura 3.3. Amplificación del plásmido pMaORI-OVA-GFP en <i>Leptospira</i> spp | 134 |
| Figura 3.4. Expresión de la proteína OVA-GFP en <i>Leptospira</i> spp transformadas con el plásmido pMaORI-OVA-GFP | 135 |
| Figura 3.5. Proliferación de células OT-II en respuesta a BMDCs infectadas con <i>Leptospira</i> spp | 137 |
| Figura 3.6. IFN γ e IL-10 en el sobrenadante de cultivo de células OT-II | 138 |
| Figura 3.7. Maduración de BMDCs inducida por <i>Leptospira</i> spp | 140 |

| | |
|--|------------|
| Figura 3.8. Proliferación de células OTII en respuesta a péptido OVA clase II y <i>Leptospira</i> spp | 141 |
| Figura 3.9. Medida de pH fagolisosomal de BMDCs infectadas con <i>Leptospira</i> spp | 142 |
| Figura 3.10. Infección con <i>L. Interrogans</i> serovar Manilae y depleción de células T CD4+ | 143 |
| Figura 3.11. Infección con <i>L. Interrogans</i> serovar Manilae en ratones WT y Tmem176b KO | 145 |
| Figura 3.12. Producción de IL-1 β por BMDCs infectadas con <i>Leptospira</i> spp | 146 |
| Figura S4.1. Expresión de TMEM176B en PBMCs de LLC | 161 |
| Figura S4.2. Co-localización de caspasa-1 activa y NLRP# en células de LLC | 162 |
| Figura S4.3. Liberación de LDH por células de LLC en cultivo | 162 |
| Figura S4.4. Evaluación de la apoptosis de células B de pacientes con LLC tratadas con IL-1 β | 163 |
| Figura S4.5. Expresión de TMEM176A en PBMCs de LLC en cultivo | 164 |
| Figura S4.6. Expresión relativa de citoquinas por BMDCs en respuesta a <i>Leptospira</i> | 165 |
| Figura S4.7. Fagocitosis de <i>Leptospira</i> por BMDCs | 166 |

| | |
|---------------|--|
| 7AAD | 7-amino-actinomicina D |
| AIM2 | Proteína ausente en melanoma 2 |
| AIRE | Proteína reguladora de autoinmunidad |
| ALL | Leucemia Linfoblástica Aguda |
| AML | Leucemia Mieloide Aguda |
| AP-1 | Proteína activadora 1 |
| APC | Célula presentadora de antígenos |
| ASC | Proteína tipo asterisco asociada a la apoptosis |
| BCL-2 | Proteína 2 asociada a linfoma B |
| BCLxL | Proteína linfoma B extra grande |
| BCR | Receptor de célula B |
| BLAST | <i>"Basic Local Alignment Search Tool"</i> |
| BMDCs | Células dendríticas derivadas de médula ósea |
| BMDMs | Macrófagos derivados de médula ósea |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| C4BP | Proteína de unión a C4b |
| CARD | Dominio de reclutamiento de caspasa |
| CASP s | Síndromes periódicos asociados a criopirinas |
| CCL2 | Ligando de quimioquina C-C 2 |
| CLRs | Receptor tipo Lectina C |
| COX-2 | Ciclooxigenasa 2 |
| CTLA-4 | Antígeno 4 del linfocito T citotóxico |
| CXCL1 | Ligando de quimioquina C-X-C 1 |
| Cy3 | Cianina 3 |
| Cy5 | Cianina 5 |
| DAMP | Patrón Molecular Asociado a Daño |
| DAP | Ácido diaminopimélico |
| DAPI | 4',6-diamino-2-fenilindol |
| DC | Célula dendrítica |
| DDAO | 7-Hidroxi-9H-(1,3-Dicloro-9,9-Dimetilacridina-2-uno) |
| dhADN | ADN doble hebra |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| dNTP | Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| DO | Densidad óptica |
| dT | Timidina |
| ECL | <i>"Enhanced luminol-based chemiluminescent substrate"</i> |

| | |
|---------------|--|
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EHEC | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| EMA | Agencia europea de medicamentos |
| EMJH | Medio McCullough-Johnson-Harris |
| FACS | Separación celular activada por fluorescencia |
| FAM | 6-carboxifluoresceína |
| FasL | Ligando de Fas |
| FDA | Administración de drogas y alimentos |
| FHR-1 | Proteína 1 Relacionada al Factor H |
| FITC | Fluoresceína |
| FLICA | <i>"Fluorescent Labeled Inhibitors of CAspases"</i> |
| FOXP1 | <i>"Forkhead box protein P1"</i> |
| GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenasa |
| GFP | Proteína fluorescente verde |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos |
| GSDMD | Gasdermina D |
| H/E | Hematoxilina/Eosina |
| HO-1 | Hemo oxigenasa-1 |
| IDO | Idolamina _{2,3} -dioxigenasa |
| IFI16 | Proteína 16 inducible por interferón |
| IFN-γ | Interferón gamma |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IL-1α | Interleuquina 1 alfa |
| IL-1β | Interleuquina 1 beta |
| IL-1R | Receptor de interleuquina 1 |
| IL-2 | Interleuquina 2 |
| IL-6 | Interleuquina 6 |
| IL-10 | Interleuquina 10 |
| IL-11 | Interleuquina 11 |
| IL-12 | Interleuquina 12 |
| IL-18 | Interleuquina 18 |
| ILC3 | Célula linfoide innata de tipo 3 |
| ILT | Receptor tipo inmunoglobulina |
| iNOS | Sintasa inducible de óxido nítrico |
| Itgb8 | Integrina activadora de TGF-β |
| ITIM | Dominio de inhibición basado en tirosinas |
| LAG-3 | Gen 3 de activación linfocitaria |
| LB | Medio Luria-Bertani |

| | |
|---------------|--|
| LBP | <i>L. biflexa</i> serovar Patoc I |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| LIM | <i>L. interrogans</i> serovar Manilae |
| LLC | Leucemia Linfoide Crónica |
| LPS | Lipopolisacárido |
| M-CSF | Factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos |
| MACS | Separación celular activada por magnetismo |
| MAMP | Patrón Molecular Asociado a Microbios |
| MAVS | Proteína mitocondrial de señalización antiviral |
| MBL | Lectina de unión a manosa |
| MCL1 | <i>"Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1"</i> |
| MCP-1 | Proteína quimioatrayente de monocitos 1 |
| MDSC | Célula mieloide supresora |
| MHC | Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| MOI | Multiplicidad de infección |
| NF-κB | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| NK | Células "natural killer" o asesinas naturales |
| NLR | Receptor tipo Nod |
| NLRC4 | Proteína 4 que contiene el dominio CARD de la familia NLR |
| NLRP1 | Proteína 1 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD |
| NLRP2 | Proteína 2 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD |
| NLRP3 | Proteína 3 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD |
| NLRP6 | Proteína 6 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD |
| NLRP7 | Proteína 7 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD |
| NLRP9b | Proteína 9b que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD |
| O.N. | <i>"over night"</i> |
| OVA | Ovoalbúmina |
| P2X7 | Purinoceptor P2X 7 |
| PAMP | Patrones Molecular Asociado a Patógenos |
| PBMCs | Células mononucleares de sangre periférica |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PD1 | Proteína de muerte celular programada 1 |
| PD-L1 | Ligando de la proteína de muerte celular programada 1 |
| PD-L2 | Ligando de la proteína de muerte celular programada 2 |
| PE | Ficoeritrina |
| PFA | Paraformaldeído |
| PRR | Receptor de Reconocimiento de Patrones |
| PYD | Dominio pirina |

| | |
|--------------------------------|---|
| RA | Ácido retinoico |
| RANTES | Ligando de quemoquinas C-C 5 |
| RIPA | Buffer de lisis de ensayos de radioinmunoprecipitación |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RPMI | Medio Roswell Park Memorial Institute |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| SFB | Suero fetal bovino |
| Spc | Espectinomicina |
| STAT3 | Transductor de señal y activador de la transcripción 3 |
| STING | Estimulador de genes del interferón |
| TA | Temperatura ambiente |
| TAE | Buffer Tris-acetato-EDTA |
| TBS | Buffer Tris salino |
| TCR | Receptor de célula T |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante beta |
| Tim-3 | “T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3” |
| TLR | Receptor tipo Toll |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TORID | Transcripto inducido relacionado a tolerancia |
| TRAIL | Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF |
| Treg | Célula T reguladora |
| Vcx | Venetoclax |
| VEGF | Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| WB | “Wester blot” |
| WT | “wild type” o salvajes |
| ZAP-70 | Proteína 70 asociada a zeta |

La homeostasis fisiológica requiere de mecanismos de regulación de la respuesta inmune para evitar respuestas contra antígenos propios y respuestas exageradas contra antígenos extraños. Estos mecanismos pueden ser manipulados en contextos fisiopatológicos como el cáncer y enfermedades infecciosas, para evitar la destrucción por el sistema inmune.

Nuestro laboratorio se ha focalizado en la caracterización de los canales iónicos Tmem176b (TORID-1) y Tmem176a (TORID-2) como moléculas inmunorreguladoras emergentes. Tmem176a y Tmem176b son capaces de regular la presentación de antígenos por las células dendríticas (DCs) a linfocitos T al regular el pH fagosomal a través de mecanismos iónicos. A nivel citosólico, el transporte iónico mediado por Tmem176 a y b inhibe la activación del inflamasoma NLRP3.

En esta maestría nos propusimos aportar conocimientos que contribuyan a la caracterización de los canales iónicos Tmem176a y Tmem176b, como moléculas inmunorreguladoras. Para esto trabajamos en un modelo infeccioso, con el patógeno *Leptospira*, y en la leucemia linfocítica crónica, una de las oncologías hematológicas más comunes en adultos en nuestro país.

En la LLC demostramos que la expresión de TMEM176A por células leucémicas se asocia a la progresión de la enfermedad. En linfocitos B leucémicos, TMEM176A inhibe la activación de caspasa-1, evitando la muerte piroptótica. La disminución en la expresión o inhibición farmacológica de TMEM176A en estas células induce su piroptosis, de una manera dependiente de caspasa 1. La asociación del inhibidor de TMEM176A a un fármaco de uso común en la clínica de la LLC, como es el venetoclax, induce la muerte de las células tumorales en niveles superiores a los obtenidos con la monoterapia. En este modelo mostramos como TMEM176A regula la activación de caspasa-1 y la piroptosis en células tumorales, siendo un posible blanco terapéutico en este tipo de leucemias.

Con respecto a la infección por *Leptospira*, observamos que la infección de células dendríticas con *L. biflexa* induce la activación de linfocitos T CD4+ específicos, mientras que esto no sucede con *L. interrogans*. Dicha capacidad de estimular los linfocitos T se pierde si se utilizan células Tmem176b^{-/-}. Esto se explicaría porque *L. interrogans* es capaz de inhibir la acidificación fagosomal. Estudios preliminares *in vivo*, en un modelo de infección crónica de ratones por *L. interrogans*, sugieren que la deficiencia genética de Tmem176b se asocia a un daño tisular mayor en los riñones, lo que se podría explicar por una respuesta de células T CD4+ disminuida y/o un aumento de la respuesta inflamatoria. En este modelo mostramos nuevos indicios de Tmem176b como regulador clave, no solo la respuesta inflamatoria, sino también del procesamiento y presentación de antígenos, con consecuencias para la subsecuente respuesta inmune adaptativa.

1.1. REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Además de su papel en la defensa del organismo, el sistema inmunitario tiene una función fundamental en el mantenimiento del medio interno y el restablecimiento de la homeostasis luego de una infección o daño. Ejemplos de esto son el rol de los macrófagos al fagocitar células apoptóticas, o las funciones de limpieza llevadas a cabo por el sistema complemento (Wynn et al. 2013; Orsini et al. 2014). El sistema inmune tiene mecanismos efectores muy potentes que pueden eliminar una gran variedad de patógenos. Temprano en el estudio de la inmunidad se vio que esto podía, si se volvía en contra del hospedador, causar daño tisular severo (Abbas et al. 2018). La regulación de la respuesta inmune es de extrema importancia para evitar que se genere daño contra componentes propios, sin comprometer la capacidad del individuo de responder a las amenazas. Hoy en día, es ampliamente aceptado que la respuesta inmune esta formada tanto por respuestas efectoras como reguladoras.

La tolerancia puede ser definida como el estado de ausencia de respuesta inmune efectora frente a un antígeno que es inducido por la exposición previa al mismo. Cabe destacar que los mecanismos de tolerancia son mecanismos activos. Cuando linfocitos específicos encuentran su antígeno pueden ser activados, desencadenando una respuesta inmune, o las células pueden ser eliminadas o inactivadas, llevando a tolerancia. El mismo antígeno puede inducir respuesta o tolerancia dependiendo de la condiciones en las que se de la exposición y la presencia o ausencia de otros estímulos concomitantes (Abbas et al. 2018). Cabe destacar que la tolerancia es antígeno específica, al contrario de lo que ocurre con la inmunosupresión terapéutica, ya que depende del reconocimiento por clones individuales de linfocitos (Schwartz 2012).

Si bien el estudio de los fenómenos de inmunoregulación se ha focalizado durante mucho tiempo en la tolerancia a componentes propios, la tolerancia frente a antígenos foráneos es también de suma importancia. Los organismos se enfrentan todos los días a grandes cantidades de antígenos inócuos contra los cuales desencadenar una respuesta inmune puede ser perjudicial, como por ejemplo antígenos derivados de los alimentos o la microbiota.

Además de la tolerancia a la propio el concepto de inmunoregulación abarca todos aquellos mecanismos cuya función es limitar y adaptar la respuesta, de manera que la misma sea efectiva para eliminar la amenaza, con un daño mínimo a los tejidos del organismo. En el desarrollo de la respuesta inmune existen una serie de puntos de control cuya función es limitar la magnitud de la misma. El ejemplo más destacado de esto es, quizás, la regulación de la respuesta de células T por receptores inhibidores como CTLA-4 y PD-1. Individuos con mutaciones en el gen CTLA4 desarrollan lesiones inflamatorias que afectan múltiples órganos, destacando el papel de estos puntos de control en el mantenimiento de la homeostasis (Zhang et al. 2016; Walker et al. 2011). Como último punto, una respuesta inmune apropiada es aquella que es eficaz para eliminar la amenaza. Cuando esto no sucede, por ejemplo en infecciones crónicas por patógenos como *M. tuberculosis*, es muchas veces la respuesta inmune exacerbada o inadecuada, y no el patógeno *per se*, lo que genera patología (Behar et al. 2014).

El sistema inmune innato tiene un rol fundamental en dirigir la respuesta inmune adaptativa posterior, colaborando en la adecuación de la misma al tipo de patógeno o amenaza que deba enfrentar. En este sentido, el sistema inmune innato es un actor clave de la regulación de la respuesta inmune no solo en el mantenimiento de la tolerancia, sino también al limitar y adaptar la

respuesta. Las células dendríticas, en particular, son centrales para articular estos fenómenos. Ciertos patógenos, y algunos tumores, utilizan mecanismos de inmunoregulación que actúan sobre la inmunidad innata en su beneficio. En este sentido, el estudio de los fenómenos de inmunoregulación aparece como clave, ya sea en el sentido de utilizar su inducción como estrategia terapéutica, en el contexto de trasplantes de células o tejidos, o por situaciones en las cuales es necesario contrarestarlos, como en ciertas infecciones o algunos tipos de cáncer.

1.2. TOLERANCIA CENTRAL Y PERIFÉRICA

La tolerancia a antígenos propios es un pilar fundamental del sistema inmune normal y fallas en la auto-tolerancia pueden llevar a patologías como ser las enfermedades autoinmunes. La auto-tolerancia puede ser inducida en linfocitos autoreactivos inmaduros en los órganos linfoides centrales (tolerancia central) o en linfocitos maduros en sitios periféricos (tolerancia periférica) (**Figura 1.1.**). El principio fundamental subyacente a estos mecanismos es la discriminación de lo propio y lo no propio, pero esto no es fácil de conseguir. Los rearrreglos génicos que ocurren durante el desarrollo de los linfocitos en los órganos linfoides centrales son al azar, y por lo tanto, inevitablemente resulta en la generación de algunos linfocitos con afinidad por antígenos propios. Los mecanismos de tolerancia eliminan o inactivan linfocitos que expresan receptores con alta afinidad para antígenos propios.

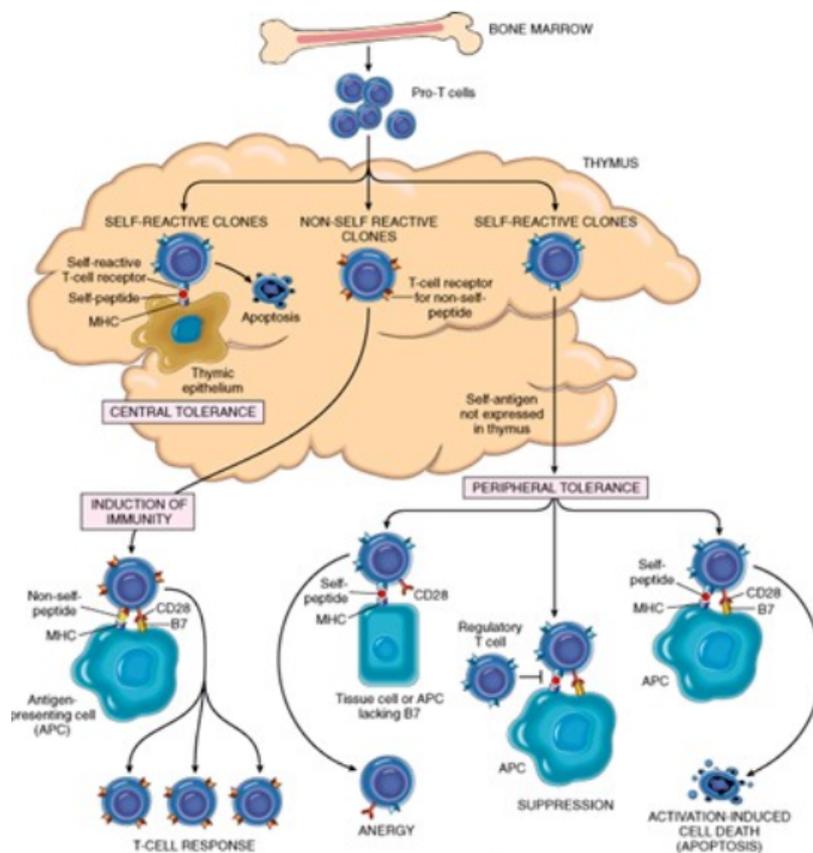


Figura 1.1. Esquema de los mecanismos de tolerancia central y periférica que operan sobre las células T. Se puede notar el papel destacado de las células presentadoras de antígeno (APC) en el balance entre inmunidad y tolerancia. Extraído de Kumar et al. Robbins Basic Pathology 8th Ed.

La tolerancia central asegura que el repertorio de linfocitos maduros vírgenes generado es incapaz de responder a antígenos propios que se expresan en los órganos linfoides donde se desarrollaron. El reconocimiento de antígenos por linfocitos inmaduros lleva a una señal negativa que causa la muerte o inactivación del linfocito, o su diferenciación a linfocitos T reguladores, mientras que las mismas señales llevarían a la activación en linfocitos maduros. Este es un mecanismo importante de inducción de tolerancia en linfocitos en desarrollo en el timo y médula ósea. Para el caso de los linfocitos T, los antígenos presentes en el timo incluyen proteínas circulantes y asociadas a células ampliamente distribuidas en los tejidos, así como antígenos de tejidos periféricos que son producidos por células epiteliales de la médula tímica bajo el control de la proteína reguladora de autoinmunidad (AIRE) (Abbas et al. 2018).

Los mecanismos de tolerancia central eliminan linfocitos recién formados fuertemente auto-reactivos. En cambio, linfocitos auto-reactivos maduros que no detectan antígenos propios con fuerza en los órganos linfoides centrales, pueden ser eliminados o inactivados en la periferia. Los mecanismos principales de tolerancia periférica son anergia, supresión por células T reguladoras (T regs), inducción del desarrollo de células T regs en vez de células T efectoras, y la eliminación de linfocitos autoreactivos del repertorio mediante la inducción de muerte celular. Estos mecanismos son los reponsables de inducir tolerancia a antígenos foráneos en determinados contextos.

Por ejemplo, el lumen intestinal aloja cerca de 100 trillones de bacterias comensales que ejercen una función crucial para el mantenimiento de la salud del organismo. Un elaborado balance entre respuesta inmune y tolerancia a la microbiota es crucial para mantener la homeostásis intestinal. Alteraciones en este proceso han sido asociadas al desarrollo de enfermedades intestinales inflamatorias, así como otras patologías (Sun et al. 2015). Este balance depende de mecanismos

regulatorios diversos que involucran tanto a la inmunidad innata como adaptativa, entre los que podemos destacar a los mediados por: linfocitos T reguladores, células B reguladoras, macrófagos activados alternativamente y células dendríticas (Sun et al. 2015). Además, es cada vez más claro el rol de la microbiota en la regulación y el mantenimiento del sistema inmune del individuo, estableciéndose como otro mecanismo de inmunoregulación (Surana et al. 2014, Nishio et al. 2012). La microbiota y el sistema inmune de las mucosas son claves también en la tolerancia a antígenos inócuos ya sea dietarios o ambientales, alteraciones en procesos de inmunoregulación en este sentido pueden llevar a patologías como alergias alimentarias o asma (Lambrecht et al. 2017).

La decisión entre inmunidad y tolerancia cuenta con el sistema inmune innato, el cual provee de señales que son cruciales para permitir la activación de una respuesta inmune adaptativa frente a una noxa. En ausencia de infección, estas señales, que incluyen citoquinas pro-inflamatorias (como IL-6 e IL-12) y moléculas co-estimuladoras, expresadas por células presentadoras de antígeno activadas, no están presentes. En estas circunstancias, el encuentro de un linfocito vírgen con un antígeno propio tiende a llevar a una señal negativa inactivadora, o puede promover el desarrollo de linfocitos reguladores, que suprimen el desarrollo de respuestas efectoras que puedan dañar los tejidos, así como la inducción de otras poblaciones de células inmunitarias con perfil regulador.

Si bien todos los mecanismos de regulación de la respuesta inmune que actúan en la periferia son fundamentales, como lo demuestran fallas en los mismos, nos centraremos en aquellos cuya acción central está dada por la regulación de la respuesta inmune innata y veremos como la misma es capaz de modular la respuesta adaptativa posterior. En este punto no podemos pasar por alto la función de las células dendríticas (DC), al actuar como directoras de la respuesta inmune.

1.3. CÉLULAS DENDRÍTICAS E INMUNOREGULACIÓN

Las células dendríticas (DCs) son actores claves en el inicio y control de las respuestas inmunes, regulando el balance entre tolerancia e inmunidad. Actúan como centinelas en los tejidos, reaccionando frente a patógenos invasores y otras señales de peligro, para luego inducir la activación y diferenciación de linfocitos T vírgenes (Katsnelson 2006). Las DCs influyen la respuesta inmune al dirigir la diferenciación de las células T en distintos subtipos funcionales. Sin embargo, también participan en la patogénesis de ciertas enfermedades, como la autoinmunidad y el cáncer (Morel et al. 2015).

Las DCs se encuentran en prácticamente todas las superficies del cuerpo actuando como centinelas. Expresan receptores mediante los cuales son capaces de reconocer patógenos y responder a un amplio abanico de señales inflamatorias, como ser ligandos de receptores tipo toll (TLRs), tipo NOD y scavengers; así como mediadores inflamatorios, citoquinas y quimioquinas (Zanoni et al. 2010). Las DCs no matan al patógeno directamente, sino que usan un enfoque aún más sofisticado. Utilizan su maquinaria proteolítica (endolisosomal y proteosomal), para degradar parcialmente los antígenos a péptidos que posteriormente serán presentados en complejos de péptido/moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en su superficie celular (Wilson et al. 2004). Aunque otras células, como los macrófagos y las células B, también pueden presentar antígenos a través del MHC, las DCs son las únicas capaces de activar células T vírgenes (Wilson et al. 2004). Las DCs desempeñan un papel director de las respuestas inmunes ya que interrogan, interpretan y transmiten la naturaleza del estímulo antigénico, llevando a distintos perfiles de polarización de las células T (Merad et al. 2013).

Las DCs inmaduras se encuentran predominantemente en los tejidos periféricos donde patrullan e

incorporan grandes cantidades de antígenos, ya sea ligados a membrana o solubles, mediante fagocitosis y macropinocitosis. Sin embargo, en un estado inmaduro, las DCs son ineficientes para mostrar complejos de MHC/péptido en su superficie ya que, por ejemplo, su actividad lisosómica está atenuada (Zanoni et al. 2010). La capacidad de mostrar complejos MHC/péptido en la superficie aumenta con el gatillamiento de receptores de reconocimiento de patógenos tales como TLR o NLR, que dirigen la maduración de la DC (Drutman et al. 2010).

Luego de activarse, las DCs maduras aumentan su maquinaria de presentación de antígenos, incluida la expresión en superficie de MHC de clase II y moléculas coestimuladoras, así como de receptores para quimioquinas presentes en linfonodo. A su vez, disminuyen su capacidad fagocítica y pierden la expresión de receptores para señales de inflamación local. Como células maduras pierden la habilidad de procesar nuevos péptidos y migran a los nodos linfáticos drenantes. Una vez allí presentarán en el contexto del MHC los antígenos procesados a células T, junto con moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86) y señales polarizantes, dadas por citoquinas como la IL-12, induciendo a las células T a diferenciarse en células T efectoras antígeno específicas (Th1, Th2, Th17, etc.) (Merad et al. 2013).

DCs residentes de los tejidos que adquieren antígenos propios o antígenos inócuos ambientales, en ausencia de respuestas inflamatorias locales, migran de manera similar a los linfonodos drenantes. Al tratarse de células no activadas, expresan niveles menores de MHC II, moléculas coestimuladoras e IL-12, y secretan mediadores con capacidad reguladora como la IL-10 y el ácido retinóico, por lo que se las llama DCs tolerogénicas (Sun et al. 2007, Akbari et al. 2001). Las DCs tolerogénicas son esenciales en el mantenimiento de la tolerancia central y periférica, al inducir la delección clonal o anergia de células T, inhibir respuestas de células T efectoras o memoria, e

inducir la generación y activación de células T regs (Domogalla et al. 2017).

El concepto original de inducción de tolerancia por parte de las DCs, le atribuía a las DCs inmaduras, con bajas cantidades de MHC y moléculas coestimuladoras en superficie, esta capacidad, mientras que, por el contrario, DCs maduras con alta expresión de CD80/CD86 activarían respuestas de células T efectoras (Shortman et al. 2001). Sin embargo, hoy en día se sabe que la inducción de tolerancia por parte de las DCs no depende exclusivamente de esto sino también del ambiente de citoquinas y factores de crecimiento presentes. Estudios recientes demostraron que DCs fenotípicamente maduras son capaces también de inducir el desarrollo de células T regs, indicando que el fenotipo no necesariamente determina la función inmunogénica o reguladora de estas células (Kryczanowsky et al. 2016). En este sentido, la maduración de las DCs tiene un alto grado de plasticidad, y células maduras diferenciadas pueden convertirse fácilmente en tolerogénicas (Munn et al. 2002).

Las DCs tolerogénicas explotan varios mecanismos para inducir tolerancia (**Figura 1.2.**). La presentación de niveles bajos de antígeno sin coestimulación conduce a la anergia de las células T y a la promoción de la diferenciación de las células T regs *in vitro* e *in vivo* (Steinbrink et al. 2002; Raker et al. 2015). La secreción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- β y la expresión reducida de citoquinas proinflamatorias por parte de las DCs contribuyen de forma crítica a la inducción de tolerancia. La producción de IL-10 por DCs tolerogénicas es indispensable para la función reguladora en múltiples entornos y el TGF- β liberado por DCs es importante para la inducción de tolerancia, ya que se ha demostrado que la ablación específica en DCs de la integrina activadora de TGF- β (Itgb8) produce autoinmunidad y colitis en ratones transgénicos CD11c-Cre/Itgb8^{fl/fl} (Travis et al. 2007).

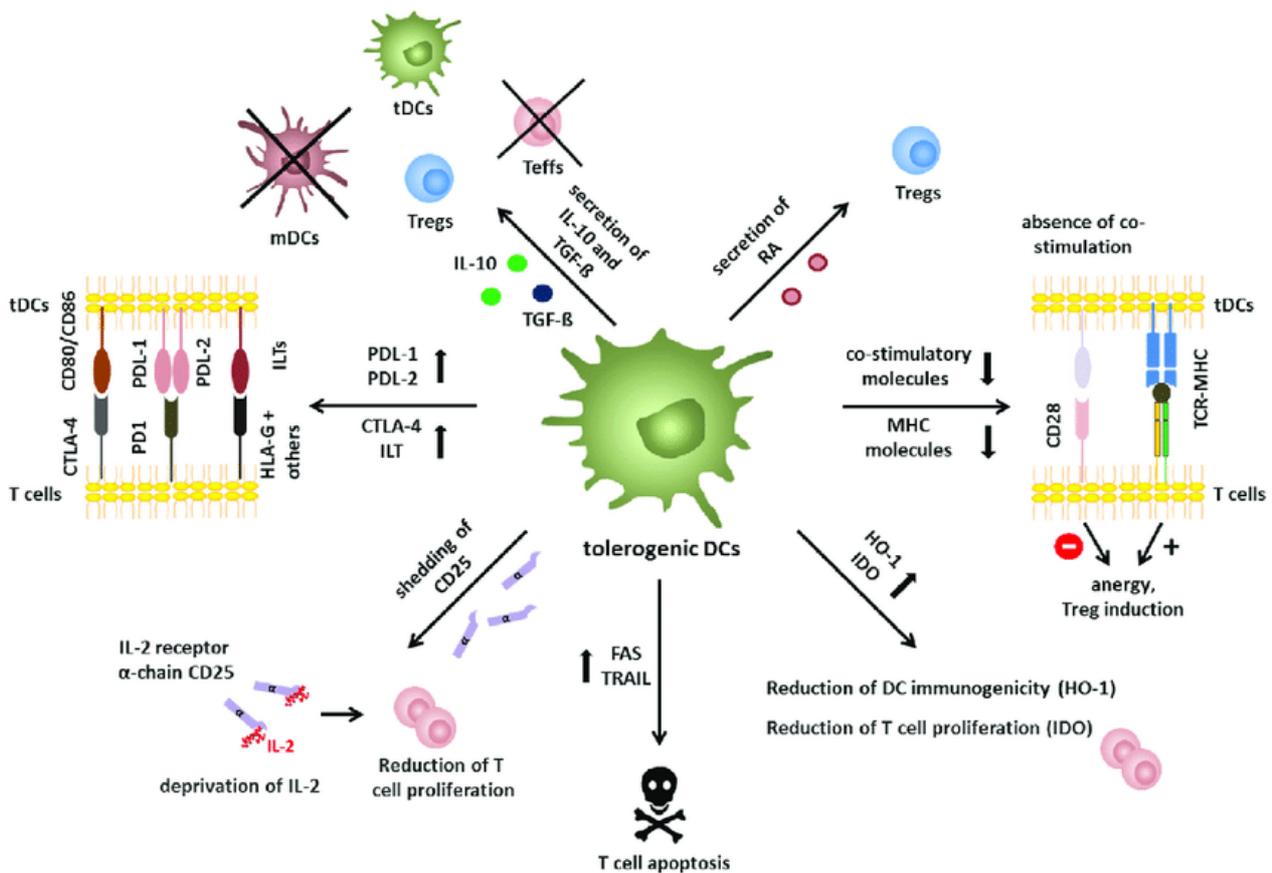


Figura 1.2. Principales mecanismos de inmunorregulación que utilizan las células dendríticas tolerogénicas. Extraído de Domogalla et al. 2017.

Varias funciones inmunosupresoras de las DCs tolerogénicas se basan en la inducción de apoptosis en células T respondedoras, incluyendo la interacción Fas/FasL y la interacción de TRAIL con su receptor (Kurts et al. 1998; Izawa et al. 2012). Las DCs tolerogénicas también pueden expresar diversos receptores inhibidores, como por ejemplo PDL-1, PDL-2, ILT y CTLA-4, que actúan sobre las células T amortiguando la señalización de TCR o compitiendo con CD28 (Keir et al. 2007; Nguyen et al. 2015; Wu et al. 2009; Laurent et al. 2010).

Las DCs tolerogénicas también alteran las respuestas de células T a través de la modulación de parámetros metabólicos, por ejemplo, mediante la liberación de IDO y la inducción de hemo oxigenasa-1 (HO-1) para controlar los niveles de triptófano y monóxido de carbono. IDO facilita la

degradación de triptófano a kineurina que conduce a una reducción en la proliferación de células T, mientras que la HO-1 inhibe la hemoglobina, dando como resultado la producción de monóxido de carbono, que conduce a una inmunogenicidad reducida en la DC (Curti et al. 2009; Chora et al. 2007). Además, las DCs tolerogénicas también son capaces de producir ácido retinoico (RA), induciendo la diferenciación de T regs (Raker et al. 2015). La eliminación de CD25 por las DCs y la subsiguiente privación de IL-2 se ha propuesto recientemente como un mecanismo adicional responsable de suprimir la proliferación de células T efectoras (Kryczanowsky et al. 2016). Si bien las DCs son centrales en las respuestas de células T CD4+ y CD8+ también pueden inducir un perfil regulador en otras poblaciones celulares como linfocitos T CD4-CD8-, linfocitos B y células NK.

Un gran número de reportes han descrito diferentes tipos y subtipos de DCs en diferentes órganos y especies. Varias de esas subpoblaciones son, o pueden ser, tolerogénicas cuando se encuentran en estado basal y convertirse a un fenotipo inmunoestimulador en presencia de señales inflamatorias. En algunos tejidos se expresan constitutivamente señales tolerogénicas de manera dominante (por ej. hígado, mucosas) mientras que en otros lugares, que no están tan expuestos al ambiente externo, estas señales pueden ser mucho menos abundantes (Gordon et al. 2014).

Las enfermedades inflamatorias crónicas humanas se caracterizan por cambios en las poblaciones de monocitos y DCs circulantes. Se reconocen varios tipos de DCs inmunoreguladoras con roles importantes en prevenir condiciones inflamatorias como la autoinmunidad, el rechazo a trasplantes y la atopía (Merad et al. 2013). Hoy en día se dispone de una vasta variedad de métodos para inducir la generación de DCs humanas con propiedades tolerogénicas *in vitro* y la transferencia pasiva de DCs inmaduras pulsadas con antígenos ha mostrado ser capaz de inducir tolerancia tanto *in vitro* como *in vivo* en numerosos modelos experimentales (Gordon et al. 2014).

Las DCs aparecen entonces como reguladores claves de las respuestas inmunes, proporcionando un vínculo entre la respuesta inmune innata y adaptativa. El balance entre DCs con perfil tolerogénico o estimulador depende de la presencia o ausencia de señales inflamatorias. A continuación veremos como las respuestas inflamatorias son desencadenadas y reguladas.

1.4. RESPUESTA INFLAMATORIA

Podemos definir la inflamación como una respuesta inespecífica y autolimitada, durante la cual se ponen en marcha un conjunto de mecanismos que coordinan elementos inmunológicos, vasculares, neurales y metabólicos (Tabas & Glass 2013). Básicamente, la respuesta inflamatoria aguda, desencadenada por infección o injuria, implica el envío coordinado de componentes sanguíneos (plasma y leucocitos) y extravasación de estos al tejido conectivo, acompañado de alteraciones sistémicas (a nivel del hígado e hipotálamo), que son funcionales a la eliminación de la noxa y/o la reparación tisular.

La inflamación generada como consecuencia de un trauma, isquemia o daño por un producto químico o radiación, generalmente no involucra la presencia de ningún microorganismo y es llamada inflamación estéril. Tanto la inflamación estéril como la inducida por infecciones, está marcada por el reclutamiento de neutrófilos y monocitos (que se diferenciarán a macrófagos en el tejido), así como la producción de mediadores como quimioquinas y citoquinas proinflamatorias. Los mecanismos que desencadenan la inflamación se basan en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) presentes en células inmunitarias residentes. Cuando los PAMPs o DAMPs se unen a los PRRs, se desencadenan vías de señalización intracelulares que confluyen en la activación de factores de transcripción como NFκB y AP-1. Estos factores actúan en conjunto para inducir la expresión de mediadores inflamatorios como COX-2, TNF-α e IL-1β.

Una respuesta inflamatoria aguda exitosa resulta en la eliminación del agente infeccioso o la injuria, a la cual le sigue una fase de resolución y reparación (Medzhitov 2008). La respuesta

inflamatoria debe estar limitada y ser autorregulada. La respuesta aguda exacerbada y sistémica frente a un patógeno puede conducir a la muerte rápida del individuo por sepsis. En otros casos, la persistencia del agente causante de infección o injuria lleva a que la inflamación aguda no resuelta derive en inflamación crónica. Esta respuesta persistente en el tiempo produce alteraciones y daño en los tejidos, terminando en enfermedad. Existen varios ejemplos de esto. Desde infecciones crónicas y enfermedades autoinmunes, hasta patologías como diabetes tipo 2, aterosclerosis, o cáncer, presentan un componente inflamatorio (Scriver et al. 2011).

En este equilibrio entre respuesta beneficiosa y enfermedad son fundamentales los mecanismos reguladores que se ponen en juego durante la respuesta inflamatoria para limitarla, tanto en magnitud como en duración. La deficiencia en cualquiera de los componentes reguladores puede llevar a una sobre activación e inflamación crónica descontrolada (Headland et al. 2015). Ejemplo de esto último son los síndromes periódicos asociados a criopirinas (CASPs) que constituyen situaciones patológicas originadas por defectos genéticos en mecanismos reguladores de la inflamación (Hoffman et al. 2001).

Las enfermedades autoinflamatorias son desórdenes genéticos raros que incluyen a los CASPs, la fiebre mediterránea familiar, síndrome de hiper IgD y síndrome periódico asociado al receptor de TNF (Dinarello et al. 2012). En 2001, Hal Hoffman describió que el defecto genético primario de los pacientes que sufren de CASPs se sitúa a nivel de mutaciones activadoras de la proteína NLRP3 (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing protein 3), llamada en un inicio criopirina (Hoffman et al. 2001). La IL-1 β juega un papel central en este tipo de enfermedades, y otras patologías. La relación causal entre las mutaciones de NLRP3 y enfermedades autoinflamatorias mediadas por IL-1 β fueron fundamentales para comprender el mecanismo de

activación post-traducciona de esta citoquina, abriendo la puerta a nuevos actores de la inflamación.

La IL-1 β no se encuentra en las células de individuos sanos sino que se requieren una serie de eventos intracelulares antes de que pueda cumplir su función. La principal fuente de IL-1 β son los fagocitos mononucleares: macrófagos y DCs. La producción de IL-1 β activa y su posterior secreción al medio extracelular suele precisar dos señales distintas: una que activa la transcripción génica y la producción de un precursor de 33 kDa, proIL-1 β , y una segunda señal que activa a un complejo intracelular de proteínas llamado inflamasoma, responsable de clivar la proIL-1 β a su forma activa.

Hoy en día es ampliamente aceptado que los inflasomas son actores centrales de las respuestas inflamatorias, siendo su regulación clave para el control de la misma. A continuación nos centraremos en estos complejos multiproteicos.

1.5. LOS INFLAMASOMAS

El término inflammasoma fue acuñado por Tschopp y colaboradores en 2002 para describir un complejo macromolecular, presente en el citoplasma de células inmunes estimuladas, responsable de mediar la activación de caspasas inflamatorias (Martinon et al. 2002). Desde este reporte inicial múltiples inflamasomas han sido identificados, siendo el ensamblado de cada uno de ellos dictado por un único PRR en respuesta a PAMPs, MAMPs o señales de alarma endógenas.

El reconocimiento del ligando inflamatorio resulta en la activación del sensor, su oligomerización y el reclutamiento de una proteína adaptadora conocida como ASC. ASC consiste en dos dominios: un dominio pirina (PYD) y un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD). Estos dominios le permiten a ASC ser un puente que une la proteína sensora y caspasa 1. La proximidad, dada por el ensamblado de espículas de ASC en complejo con caspasa 1, lleva al autoproteólisis de esta última resultando en la forma activa de la proteasa. La caspasa 1 activa inicia respuestas corriente abajo, incluidas el procesamiento y la liberación de la forma activa de las citoquinas pro inflamatorias IL-1 β e IL-18, así como la muerte celular por piroptosis (**Figura 1.3.**) (Broz et al. 2016).

Al momento, ha sido confirmado que cinco proteínas receptoras son capaces de ensamblar inflamasomas, incluidas los miembros NLRP1, NLRP3 y NLRC4, de la familia de proteínas conteniendo repetidos ricos en leucina y dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NLR), así como las proteínas ausente en melanoma 2 (AIM2) y pirina. Este set de inflamasomas llamados canónicos se complementan con vías no canónicas, cuyos blancos son caspasa 11 en ratón y caspasa 4 y/o 5 en humanos. Pueden existir además otras vías menos caracterizadas, como ser las mediadas por las proteínas NLRP6, NLRP7, NLRP2, NLRP9b y la proteína 16 inducible por interferón γ (IFI16) (Broz et al. 2016; Place et al. 2018). A pesar de su localización citosólica, los

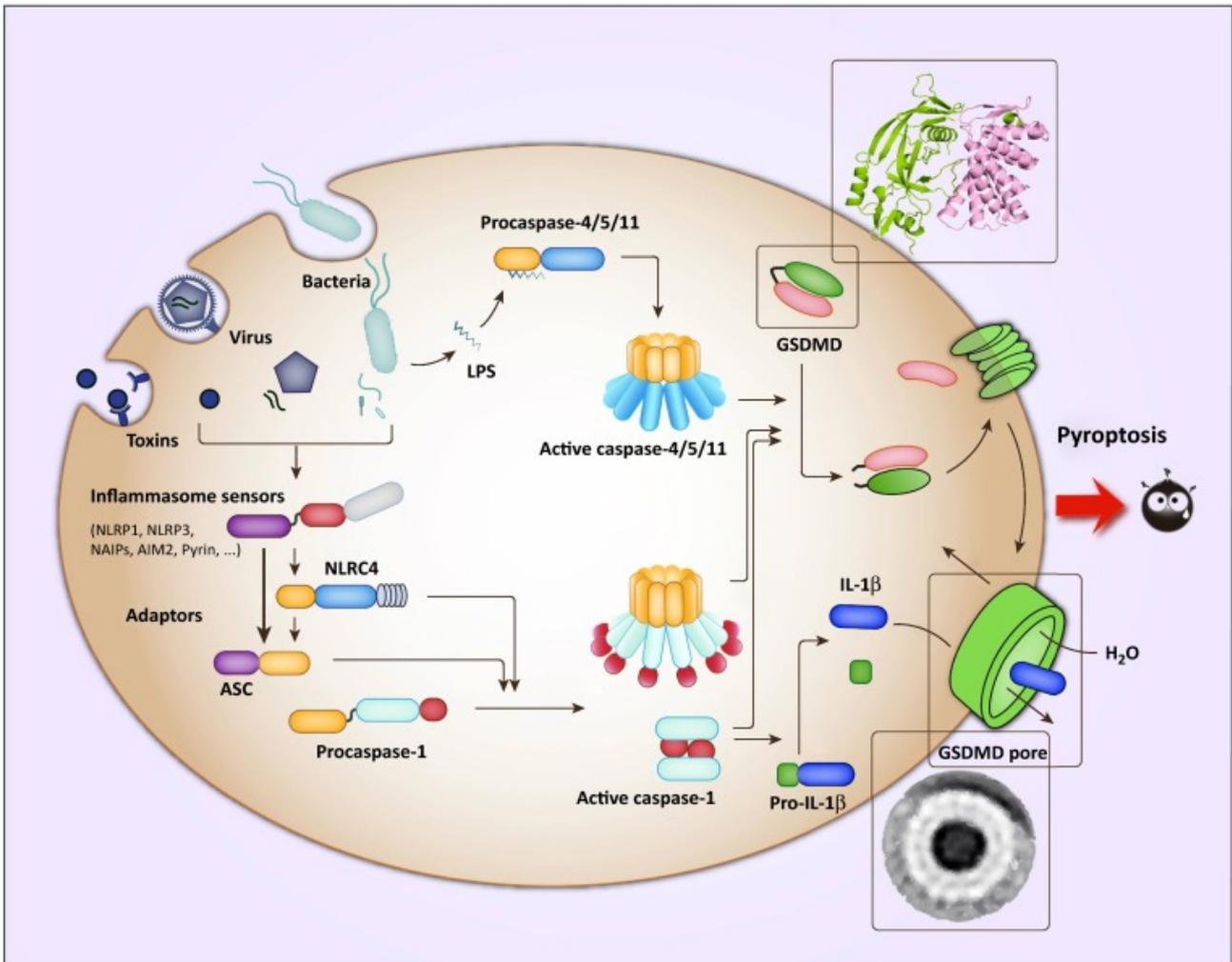


Figura 1.3. Activación de los inflammasomas y piroptosis. Las proteínas sensoras de los inflammasomas canónicos detectan diversas señales microbianas y activan a caspasa-1 a través del adaptador ASC, o de NLRC4. La caspasa-1 activa puede clivar entonces la pro-IL-1 β y la pro-IL-18, para generar la forma activa de estas citocinas. Las caspasas -4, 5 y 11 se activan mediante el reconocimiento directo de LPS en citosol celular. La caspasa-1 y la caspasa-11/4/5, en su forma activa, escinden GSDMD entre sus dominios N-terminal (verde) y C-terminal (rosa) rompiendo las interacciones autoinhibitorias entre los dos dominios. El dominio N-terminal liberado se une a los fosfoinositidos en la membrana plasmática y oligomeriza para generar poros de membrana de aproximadamente 12 a 14 nm de diámetro interno. La formación de poros interrumpe el potencial osmótico, lo que resulta en una hinchazón de las células y la lisis final. Los poros también pueden servir como una puerta para la liberación extracelular de IL-1 β maduro. La estructura cristalina de GSDMD y una imagen de microscopía electrónica de los poros formados por GSDMD se muestran en la parte superior e inferior derecha, respectivamente. Extraído de Shi et al. 2016.

inflammasomas son capaces de montar una respuesta efectiva contra bacterias extracelulares, intravacuolares o intracelulares, hongos y virus. Además son capaces de sensor sustancias cristalinas como sílica y aluminio y señales endógenas de daño como el ATP.

Los inflammasomas han sido reconocidos por su rol crucial en la defensa de los organismos contra los patógenos, sin embargo, la desregulación en la activación de los inflammasomas se ha vinculado

al desarrollo de cáncer y autoinmunidad, así como enfermedades metabólicas y neurodegenerativas. En este sentido, el control estricto del ensamblado y señalización de los inflamasomas es crucial para permitir al sistema inmune iniciar respuestas antimicrobianas e inflamatorias, evitando el daño tisular. Se han descrito numerosos mecanismos reguladores, incluidos el control a nivel transcripcional y post-transcripcional, modificaciones post-traduccionales, y varias proteínas capaces de regular los inflamasomas al nivel de los receptores, ASC o las caspasas (Broz et al. 2016). Puntos claves de regulación se encuentran tanto a nivel del ensamblado del inflamasoma, interacción entre las proteínas sensoras y ASC o ASC y caspasa 1, así como a nivel del reconocimiento y activación de las proteínas sensoras frente a distintos estímulos.

Dentro de los NLRs, el NLRP3 es el mejor caracterizado y más ampliamente estudiado de los inflamasomas, probablemente por su capacidad de ser activado por una vasta variedad de estímulos asociados a infección e inflamación estéril. De manera similar a la propia IL-1 β , el NLRP3 requiere de dos pasos de activación. Primero debe ser transcrito y traducido para luego ser activado (Gurung et al. 2015). El mecanismo exacto por el cual varios estímulos son capaces de activar el inflamasoma NLRP3 permanece poco claro, sin embargo, estudios recientes indicarían que podrían estar involucradas vías canónicas y no canónicas de activación.

De forma canónica, el inflamasoma NLRP3 es activado por bacterias Gram-positivas como *S. aureus*, virus como influenza, toxinas formadoras de poros, así como ligandos endógenos y sustancias cristalinas como el ATP, la sílica y el aluminio. Se cree que en lugar de interactuar directamente con la proteína sensora estos activadores inducen uno o más eventos corriente abajo, o perturbaciones dentro de la célula, que llevan a su activación. Los eventos generalmente aceptados que activarían al inflamasoma NLRP3 incluyen: el eflujo de K⁺, la generación de ROS

mitocondriales, la liberación de catepsina como resultado de desestabilización de la membrana fagosomal, la liberación de ADN mitocondrial o cardiolipina, y la translocación de NLRP3 a la mitocondria a través de la molécula adaptadora MAVS (Vanaja et al. 2015). Otras señales están descritas pero permanecen aún controversiales. Nuestro interés se centra particularmente en la relación entre el flujo iónico intracelular y la regulación del inflamasoma NLRP3.

La alteración de la homeostasis iónica intracelular en respuesta a los activadores de inflamasomas ha ido tomando un peso considerable en la literatura. En estudios pioneros en la década de los 90' han mostrado que el eflujo de K⁺ es responsable de la maduración de la pro-IL-1 β (Perregaux et al. 1998). Se ha propuesto que la reducción de los niveles intracelulares de K⁺ es la condición necesaria y suficiente para activar al inflamasoma NLRP3 ante estímulos tan variados como tratamiento con ATP, fagocitosis de material particulado o aún exposición a un medio hipotónico (Munoz-Planillo et al. 2013). A pesar de la importancia reconocida del eflujo de K⁺ en la activación del inflamasoma NLRP3, la identidad molecular del/los canal/es que median ese transporte permanecen aún desconocidas (Latz et al. 2013). Además, la relación del flujo de otros cationes, en particular del calcio, con el eflujo de K⁺ es un tema mal comprendido y de intensa investigación. Quedan entonces aún muchas preguntas sin responder en relación al impacto de la homeostasis iónica en la activación de inflamasomas y en cuanto a que moléculas estarían participando en este proceso.

1.6. MUERTE CELULAR POR PIROPTOSIS

Como mencionamos antes, la activación de los distintos inflamasomas puede conducir a la generación y secreción de la forma activa de potentes citoquinas proinflamatorias y a la muerte de la célula por piroptosis. La piroptosis se define actualmente como una forma de muerte celular programada necrótica, mediada por gasdermina (Shi et al. 2017). Se caracteriza por un aumento del tamaño celular, condensación nuclear, disrupción de la membrana celular y liberación de citoquinas inflamatorias y DAMPs, por lo que se la considera un tipo de muerte celular inmunogénica (Man et al. 2017; Jorgensen et al. 2015).

En los últimos años se ha establecido como un mecanismo efector general de la respuesta inmune innata, alejándose de la visión inicial de ser un mecanismo auxiliar a la liberación de IL-1 β (Shi et al. 2017). Durante mucho tiempo se refirió a la piroptosis como un tipo de muerte celular mediada por caspasa-1 que ocurría en los monocitos. El descubrimiento de que la caspasa-11 en ratón y las caspasas-4/5 en humano podían inducir piroptosis, de manera independiente de caspasa-1, en respuesta al sensado de LPS en el citoplasma celular, expandió los mediadores de esta forma de muerte de caspasa-1 a las caspasas inflamatorias en general (Shi et al. 2014). La identificación de Gasdermina D (GSDMD), como el sustrato de las caspasas inflamatorias responsable de ejecutar la muerte por piroptosis, expandió notablemente este campo de investigación (Shi et al. 2015; Kayagaki et al. 2015).

Estudios bioquímicos y funcionales revelaron el mecanismo de acción de GSDMD, el sustrato compartido de caspasa-1 y caspasa-4/5/11, para conducir a la piroptosis (Ding et al. 2016; Aglietti et al. 2016; Liu et al. 2016; Sborgi et al. 2016). GSDMD es una proteína altamente conservada en mamíferos de 480 aminoácidos que se divide en dos dominios, un dominio C-terminal inhibitorio y

uno N-terminal efector, unidos entre si por un largo bucle (Shi et al. 2015). Luego de la activación canónica del inflamasoma o el estímulo por LPS citosólico, GSDMD es clivada por las caspasas inflamatorias en un sitio consenso de reconocimiento por estas proteínas, presente en la región de unión. El clivado separa los dos dominios eliminando la autoinhibición y permitiendo al dominio N-terminal unirse a membranas lipídicas donde oligomeriza formando poros de un diámetro interno de 14-16 nm aproximadamente (**Figura 1.3.**) (Ding et al. 2016; Aglietti et al. 2016; Liu et al. 2016; Sborgi et al. 2016). A través de estos poros puede salir contenido intracelular al exterior, siendo el principal mecanismo de liberación de IL-1 β (Evavold et al. 2018).

Se cree que la acumulación de poros en la membrana llevaría a la muerte de la célula por lisis osmótica y se ha demostrado que la expresión del dominio N-terminal de GSDMD en células de mamífero es suficiente para inducir piroptosis, presentando una unión robusta y específica a lípidos fosfoinositidos, presentes en la membrana celular (Kagayaki et al. 2015; Shi et al. 2015; Ding et al. 2016; Chen et al. 2016).

Es importante destacar que en algunos tipos celulares como macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs), células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) y neutrófilos puede existir activación del inflamasoma y liberación de IL-1 β , con clivado de GSDMD, sin una muerte inmediata de la célula (Chen et al. 2014; Evavold et al. 2018; Zanoni et al. 2016). A su vez, puede existir muerte celular por piroptosis sin producción de IL-1 β . Como ejemplo, las caspasas-11/4/5 no procesan IL-1 β e IL-18, sin embargo, la activación de caspasa-11 es capaz de inducir piroptosis, y la liberación de niveles bajos de IL-1 β de manera dependiente del inflamasoma NLRP3 (Shi et al. 2014). En células que no presentan NLRP3 la muerte por piroptosis puede ser el resultado principal del reconocimiento de LPS. Esto destaca que la producción de IL-1 β y la muerte por piroptosis no

son dos eventos que tengan que necesariamente ocurrir al mismo tiempo en la misma célula.

Hoy en día se sabe que la piroptosis no se restringe a un tipo celular específico como se creía en un principio. De hecho, GSDMD se expresa abundantemente en diferentes tejidos y tipos celulares, con altos niveles de expresión en el epitelio gastrointestinal y la piel (Tamura et al. 2007). El rol crítico de GSDMD en la inmunidad innata y el shock séptico es sólo un inicio para comenzar a apreciar las funciones biológicas de la piroptosis. De hecho, las gasderminas están asociadas a un amplio espectro de patologías, incluidas la alopecia, el asma, el cáncer de mama, el cáncer gástrico, el cáncer colorectal y la pérdida de audición, por lo que comprender su regulación es de suma importancia (Feng et al. 2018).

1.7. TMEM176A Y TMEM176B

Tmem176b se describió por primera vez como un transcrito específicamente sobreexpresado en trasplantes de corazón tolerados en rata, al cual llamaron inicialmente TORID, por transcrito inducido relacionado a tolerancia (Tolerance Related and Induced transcript). Este transcrito de rata muestra homología con los transcritos *LR8/Clast1* en ratón y *LR8* en humano (Louvet et al. 2005). Previamente, *TORID/LR8* humano había sido identificado como un transcrito de expresión diferencial entre dos poblaciones de fibroblastos en cultivo, mientras que el ortólogo de ratón (*Clast1/LR8*) fue identificado como un transcrito sobreexpresado en células B luego de la estimulación con CD40 ligando (Lurton et al. 1999; Maeda et al. 2006).

TMEM176B comparte una estructura similar con TMEM176A (o HCA 112), con quien presenta un 28.5% de identidad en rata y 32% en ratón (Louvet et al. 2005). TMEM176A fue identificado inicialmente como un autoantígeno tumoral presente en pacientes con carcinoma hepatocelular, atribuyéndosele un posible rol en la inmunoevasión por parte del tumor (Wang et al. 2002). Además, se lo encontró como un transcrito sobreexpresado en los túbulos proximales del riñón de ratones que presentaban proteinuria, apareciendo junto con genes involucrados en el metabolismo, vías de degradación o en la regulación de la inflamación (Nakajima et al. 2002). Es interesante que estos dos genes se encuentran adyacentes en el mismo cromosoma, comparten un patrón de expresión y regulación similar y existe evidencia de que interactúan físicamente entre sí formando multímeros (Louvet et al. 2005; Condamine et al. 2010). Imágenes de inmunofluorescencia han revelado una co-localización intracelular de ambas proteínas, y se ha demostrado la sobreexpresión de TMEM176A en células deficientes en TMEM176B, sugiriéndose un mecanismo de compensación funcional (Drujon et al. 2016).

TMEM176A y B son miembros distantes de la familia de proteínas MS4A (membrane-spanning 4-domain family, subfamily A), la cual tiene 18 miembros hasta el momento, destacándose a CD20 y FcεRIβ. Si bien algunos de sus miembros tienen funciones ampliamente descritas, la función de muchas proteínas de la familia MS4A es pobremente conocida, sugiriéndose que comprenden un conjunto de proteínas adaptadoras y reguladores del transporte iónico (Eon Kuek et al. 2015). TMEM176A y B comparten características con el resto de las proteínas de la familia MS4A, atraviesan la membrana cuatro veces, tienen un tamaño similar, y una organización intrón-exón de sus genes también parecida (**Figura 1.4.**) (Eon Kuek et al. 2015). Un análisis de secuencia predice que TMEM176B presentaría un motivo ITIM (dominio de inhibición basado en tirosinas) en una de sus colas citoplasmáticas, estos motivos clásicamente se asocian a la propagación intracelular de señales inhibitorias, sin embargo la relevancia biológica en este caso resta ser explorada (Eon Kuek et al. 2015). Los genes MS4A se encuentran en la mayoría de los grupos de vertebrados, mientras que los Tmem176 solo en mamíferos y peces óseos (Zuccolo et al. 2010).

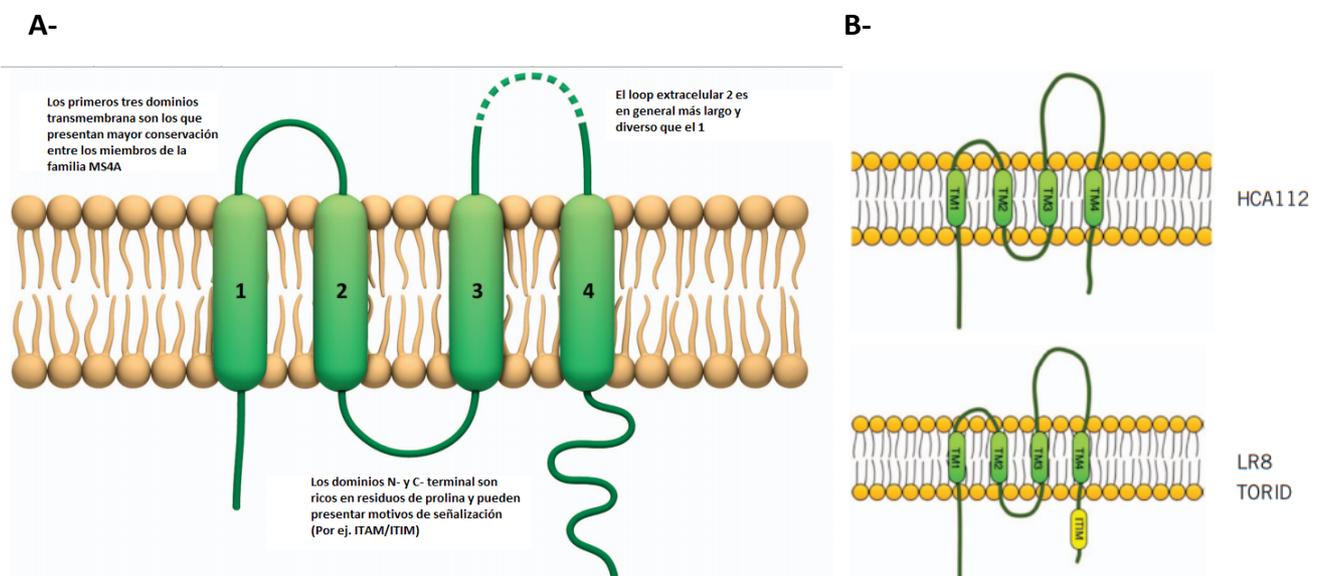


Figura 1.4. Estructura de TMEM176A y B. A- Se muestra un diagrama de la topología consenso de la familia de proteínas MS4A, destacándose las características más relevantes B- Se representa un esquema de la disposición de TMEM176A y B en la membrana citoplasmática, nótese que TMEM176B presentaría un dominio ITIM (dominio de inhibición basado en tirosinas) en una de sus colas citoplasmáticas. Imágenes adaptadas de Eon Kuek et al. 2015.

Tanto TMEM176A como TMEM176B pueden ser consideradas proteínas de expresión ubicua en mamíferos, no estando restringidas a ningún tejido en particular en las especies estudiadas. La expresión de TMEM176A estaría regulada, al menos en parte, a nivel epigenético, mostrándose una asociación entre la hipermetilación del promotor y una disminución de transcritos de *Tmem176a* en algunas líneas y tejidos tumorales (Wang et al. 2017; Gao et al. 2017). La expresión de transcritos de *Tmem176a* y *b* en tejidos de rata y ratón fue analizada en diferentes trabajos utilizando PCR cuantitativa, encontrándose que, en líneas generales, se expresa preferencialmente en tejidos linfoides (Louvet et al. 2005; Condamine et al. 2010). La expresión del ARN mensajero de *Tmem176a* en ratón sigue exactamente el mismo patrón que para *Tmem176b* (Condamine et al. 2010). En humano existe una expresión alta del ARN mensajero para ambas proteínas en riñón, hígado, colon, intestino delgado y ovario, además, los transcritos de *Tmem176b* también se encontraron presentes en gran cantidad en pulmón, cerebro y timo (Cuajungco et al. 2012).

A nivel de leucocitos, en el trabajo de Louvet et al. (2005) la mayor expresión de TMEM176B en rata fue encontrada en células dendríticas, particularmente en la subpoblación CD4+, y macrófagos peritoneales. En contraste, se encontraron niveles bajos de expresión en monocitos y células B y no se pudo detectar expresión en otras células de la línea linfóide como linfocitos NK y diferentes subtipos de células T (Louvet et al. 2005).

En ratón se mostró un patrón de expresión similar, encontrándose una expresión mayor de TMEM176A y B en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) y células dendríticas convencionales CD11b/c+ (Condamine et al. 2010). En un trabajo reciente se ha evidenciado una expresión preferencial de los transcritos para *Tmem176a* y *b* en células que presentan el factor de transcripción ROR γ t: células T γ δ e ILC3 de ratón, y células Th17 de ratón y humanas (Drujon et al.

2016). Esto es coherente con un estudio que señala a *Tmem176a* y *b* como parte de un grupo restringido de 11 genes cuya expresión depende del factor de transcripción ROR γ t en células Th17 (Ciofani et al. 2012). En concordancia con esto, una sobreexpresión de ambos homólogos fue encontrada en muestras de sangre total de pacientes con esclerosis múltiple, una enfermedad con un fuerte componente inflamatorio y en la cual se sospecha el rol patogénico de las células Th17 (Nickles et al. 2013). Hasta donde se tiene conocimiento, el patrón de expresión de TMEM176A y B no fue analizado en otras células del sistema inmunitario en humanos.

En lo que refiere a su localización intracelular, en una primera instancia se describió la presencia de TMEM176B en el endofagolisosoma de células dendríticas y en el área perinuclear de las mismas (Louvet et al. 2005; Segovia et al. 2014). Recientemente se mostró la colocalización de TMEM176B, presente en el área perinuclear, con proteínas del aparato de Golgi en células Th17, DCs derivadas de monocitos humanos y células HeLa. Actualmente se postula que TMEM176B se concentraría en vesículas asociadas a la red trans Golgi de donde pueden emanar al (o ser recicladas del) sistema endosomal. Estudios de inmunofluorescencia mostraron una fuerte colocalización de TMEM176A y B en el área perinuclear, reminiscente al aparato de Golgi, así como en un marcado puntiforme, que podría corresponder a estructuras tipo vesículas, dispersas en el citoplasma (Drujont et al. 2016).

Tomado en conjunto, parece claro que TMEM176A y B presentan un patrón idéntico de expresión en los tejidos y células estudiadas, tanto en roedores como en humanos, así como una misma localización intracelular. Además, se ha evidenciado que la expresión de TMEM176A está significativamente aumentada en células Th17 TMEM176B^{-/-}, pudiendo ser este un mecanismo para compensar la pérdida de una de ellas y preservar su función compartida (Drujont et al. 2016).

Alteraciones en estos patrones de expresión parecen estar relacionadas con patologías como el cáncer (Cuajungco et al. 2012).

En cuanto a su función, TMEM176B fue identificado por estar sobreexpresado en células infiltrantes en transplantes tolerados, lo que sugiere que puede estar involucrada en mecanismos activos de tolerancia, siendo una molécula asociada a inmunoregulación (Louvet et al. 2005). La expresión de TMEM176A y B en BMDC disminuye luego de un estímulo inflamatorio, y la inhibición de la expresión de estas proteínas en células dendríticas inmaduras aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras y su capacidad de inducir proliferación, estando vinculada entonces a mantener el estado inmaduro de células dendríticas (Condamine et al. 2010). En relación con esto, *Tmem176a* y *b* han sido descritos como genes expresados diferencialmente en células dendríticas migratorias capaces de disminuir la respuesta a vacunas, reforzando su papel en evitar la activación de células dendríticas (Anandasabapathy et al. 2014). Cabe destacar que TMEM176A y B se expresan también en células no inmunes, por lo que deben tener otra función más allá de esta.

Recientemente, nuestro grupo ha caracterizado la función molecular de esta proteína. En estudios electrofisiológicos realizados en oocitos de *Xenopus* la sobreexpresión de TMEM176B se asoció a una corriente de cationes monovalentes en respuesta a una disminución del pH, actuando como un canal de cationes no selectivo (Segovia et al. 2014). La co-sobreexpresión de TMEM176A y B provocaría una corriente mayor que la encontrada para TMEM176B individualmente (Drujont et al. 2016). Como se mencionó antes, TMEM176B se localiza a nivel de la membrana de endosomas y fagosomas en DCs, donde tiene función en la regulación del pH fagosomal, DCs TMEM176B^{-/-} muestran un pH fagosomal alcalino mientras que las salvajes presentan un pH fagosomal neutro (Segovia et al. 2014). Estos resultados serían compatibles con un rol de TMEM176B como

responsable del flujo de cationes desde la luz del fagosoma hacia el citosol, favoreciendo entonces la actividad de la ATPasa vacuolar y la acidificación de la luz fagosomal. En un modelo de trasplante en rata, se demostró que TMEM176B promueve el procesamiento y la presentación cruzada de antígenos del órgano trasplantado por BMDCs tolerógenas favoreciendo, de esta manera, el desarrollo de tolerancia (Segovia et al. 2014). Esto hace suponer que TMEM176B podría tener una función central en la presentación cruzada de antígenos por DCs, y en el vínculo entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Además, en un modelo de ratón deficiente en TMEM176B generado por el grupo de Tokuhiisa T, se encontró que aproximadamente un 65 % de los animales presentan ataxia severa (Maeda et al. 2006). Fenotipos similares han sido encontrados en ratones deficientes en canales iónicos.

Como se mencionó antes las corrientes de iones en el citoplasma pueden regular la activación del inflamasoma NLRP3. Sin embargo, la identidad molecular de los canales involucrados en la regulación de la homeostásis iónica responsables de la activación de los inflamasomas es en muchos casos desconocida (Triantafilou et al. 2014). Resultados no publicados de nuestro grupo de trabajo muestran a TMEM176A y B como canales iónicos capaces de regular al inflamasoma Nlrp3 tanto *in vitro*, como *in vivo* en modelos tumorales y de infección viral en ratones.

En este sentido, existe un vínculo interesante y poco explotado entre el inflamasoma, el procesamiento de antígenos y la respuesta inmune adaptativa. En este eje creemos que TMEM176A y B podrían ocupar un papel central, ya que se ha mostrado su función en la regulación iónica, el procesamiento de antígenos y la activación del inflamasoma en células claves, como son las células dendríticas. Además, existen evidencias que sugieren la participación de TMEM176A y B en fenómenos de los cuales participaría la respuesta inmune adaptativa, como ser:

el cáncer, las enfermedades autoinflamatorias y la respuesta a vacunas.

La expresión de TMEM176A y B ha sido asociada a cáncer. Se han evidenciado cantidades aumentadas de ambas proteínas en linfoma, y de TMEM176A en carcinoma de pulmón humanos, cuando se compara con tejidos normales. También alteraciones en la relación entre TMEM176A y B se encontraron en cáncer de mama, hígado, tejido linfoide y piel (Cuajungco et al. 2012). TMEM176B se ha encontrado sobre-expresado en células endoteliales tumorales, estando relacionado a la migración de estas células (Otsubo et al. 2014). Más recientemente, se ha encontrado una disminución en la expresión de TMEM176A en líneas celulares y muestras primarias de cáncer de esófago y colorectal, comparado con tejidos normales; y se ha asociado la misma a parámetros clínicos relevantes (Wang et al. 2017; Dan Gao et al. 2017).

OBJETIVOS GENERALES

En este trabajo nos propusimos profundizar de manera general en la biología de TMEM176A y B. Para esto dividimos el trabajo en dos enfoques distintos pero complementarios. Como se mencionó antes, nuestro grupo de trabajo ha logrado mostrar que TMEM176A y B son reguladores negativos del inflammasoma Nlrp3 y que esto tiene profundas implicancias en modelos tumorales en ratón. En estos trabajos el foco siempre se ha puesto en el papel de estas proteínas en células de la inmunidad, orquestando la respuesta inmune innata y adaptativa en torno al tumor. Sin embargo, varios trabajos muestran una expresión alterada de TMEM176A y/o B en la propia célula tumoral. En este sentido, nos pareció interesante estudiar que función estarían cumpliendo estas proteínas en la célula cancerosa y cuales podrían ser las implicancias de cambios en la expresión de estos homólogos para la biología de la misma.

Por otro lado, en lo que refiere a su función en la célula dendrítica, la regulación que ejerce TMEM176B sobre el pH fagolisosomal puede tener fuertes implicancias en el procesamiento de antígenos y la consecuente respuesta adaptativa de células T. Para profundizar en este aspecto aprovechamos la disponibilidad de ratones *Tmem176b*^{-/-} y realizamos ensayos *in vitro* de presentación de antígenos, así como ensayos *in vivo* de infección, en el contexto de la poco comprendida respuesta inmune adaptativa a *Leptospira* spp.

OBJETIVOS GENERALES

- Estudiar la expresión y función biológica, así como su potencial como blanco terapéutico, de TMEM176A y B en el contexto de la LLC.
- Generar conocimiento y desarrollar herramientas que contribuyan al estudio de la

respuesta inmune mediada por células contra *Leptospira* spp, y evaluar, en este contexto, el rol de la molécula inmunoreguladora Tmem176b.

CAPÍTULO II: TMEM176A regula la activación del inflamasoma y la muerte celular por piroptosis en la Leucemia Linfoide Crónica progresiva

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. MECANISMOS TUMORALES DE INMUNOREGULACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo occidental, precedido únicamente por las enfermedades cardiovasculares, y Uruguay no es una excepción (Globocan 2018). Presenta características distintivas que son adquiridas de forma secuencial en el desarrollo del tumor, como la capacidad de mantener una proliferación crónica y la resistencia a la muerte celular (Hanahan & Weinberg 2011). Además, las células tumorales desarrollan mecanismos para evadir el ataque por el sistema inmune (Vinay et al. 2015). Para lograr esto, los tumores no crean un conjunto nuevo de mecanismos desde cero, sino que exageran patológicamente circuitos reguladores normales que controlan la tolerancia a lo propio.

Paul Ehrlich fue uno de los primeros en proponer el concepto de que el sistema inmune es crítico en la protección del individuo contra el cáncer (Ehrlich 1909). Más tarde, Frank MacFarlane Burnet y Lewis Thomas postularon la hipótesis de la inmunovigilancia del cáncer, donde manifestaban que las células del sistema inmune podían detectar y destruir las células tumorales, previniendo la manifestación clínica del tumor (Burnet 1970). El término inmunovigilancia ha evolucionado a un concepto más complejo y amplio, el de inmunoección del cáncer, que se define por tres eventos claves: eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al. 2002; Quezada et al. 2011). En la primera fase de eliminación, los sistemas inmunes innato y adaptativo actúan juntos para erradicar el tumor en desarrollo (Quezada et al. 2011).

Aún no es del todo claro como el sistema inmune reconoce a las células tumorales y se activa en respuesta a ellas. Se cree que señales de peligro (DAMPs), liberadas por células tumorales moribundas o recientemente transformadas, son importantes para activar el sistema inmune (Chow et al. 2012). En este sentido, evidencia reciente indicaría que el ADN derivado del tumor, sensado por la vía del gen inductor de interferón (STING), sería el principal DAMP responsable de desencadenar la respuesta anti tumoral (Woo et al. 2015). Estas señales de peligro pueden ser reconocidas por células de la inmunidad innata, las que pondrían en funcionamiento mecanismos efectores contra el tumor (Woo et al. 2015). Además de permitir un control inicial, la respuesta inmune innata es fundamental para activar respuestas de células T CD4+ y CD8+ antitumorales.

Si la eliminación no es completamente exitosa, se entra en la fase de equilibrio. En esta fase las células tumorales experimentan cambios que ayudan a su supervivencia. Los tumores son moldeados por el ambiente inmunológico en el que se forman, lo que conduce normalmente a la generación de tumores que son capaces de resistir los mecanismos de erradicación tumoral, mediados por el sistema inmune, y crecer hasta ser clínicamente detectables, entrando en la fase de escape (Dunn et al. 2002). La capacidad de evadir al sistema inmune puede deberse a: una inmunogenicidad reducida, una resistencia a los mecanismos citotóxicos de las células inmunes y/o a la generación de una red inmunoreguladora. A continuación nos centraremos en este último punto.

En la inmunoregulación inducida por el tumor participan células inmunosupresoras así como factores solubles, proteínas de membrana y proteínas intracelulares. Varios factores producidos por células tumorales, y células del sistema inmune, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la interleuquina 10 (IL-10) y la

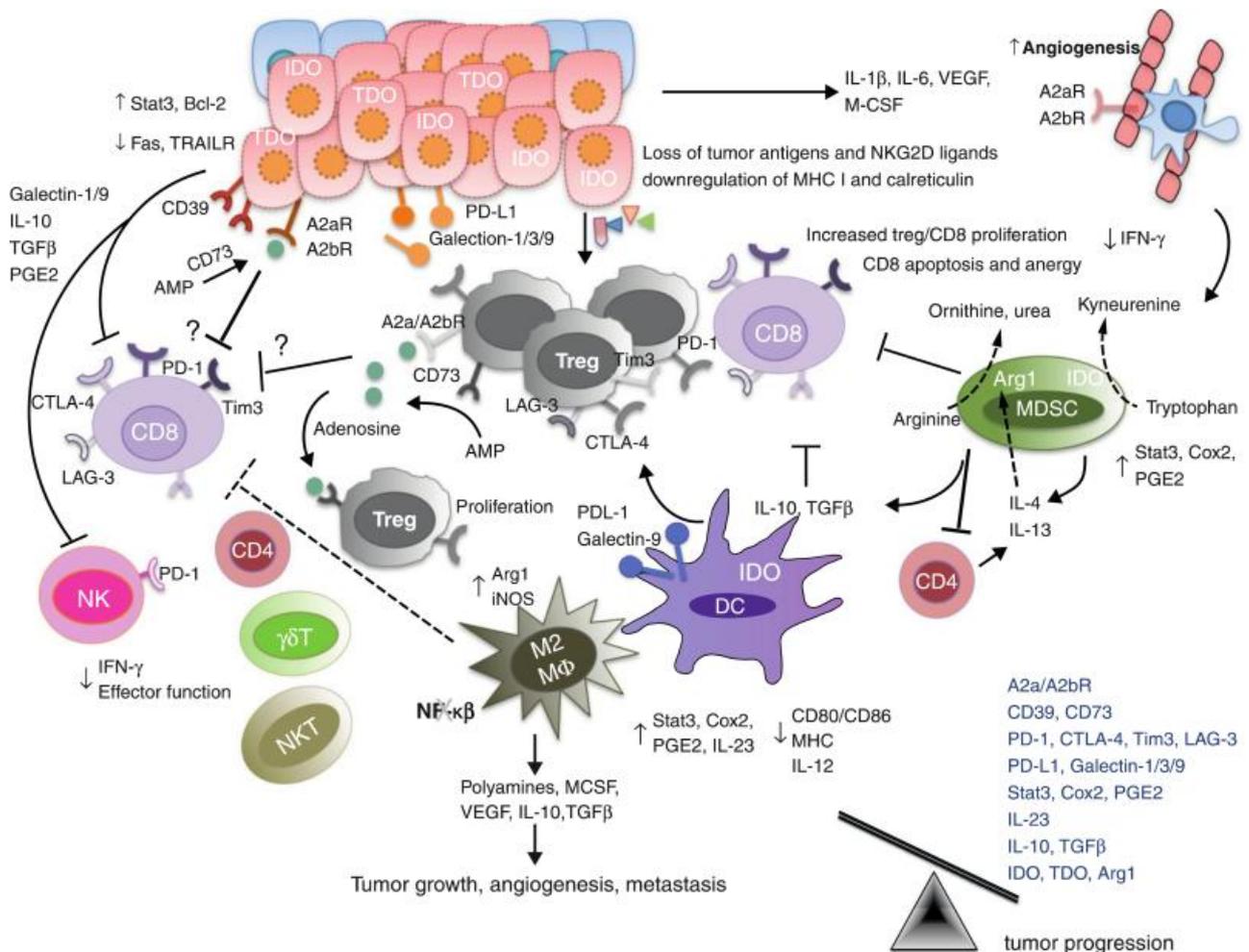


Figura 2.1. Fase de escape de la inmunoección de cáncer. Las células tumorales que sobreviven y logran escapar al proceso de eliminación son capaces de evadir el reconocimiento inmunitario. Esto lo logran a través de la pérdida de antígenos tumorales, MHC de clase I, o moléculas coestimuladoras, la expresión de moléculas de resistencia aumentada (STAT-3), supervivencia (molécula anti-apoptótica bcl2) e inmunosupresión (IDO, TDO, PD-L1, galectina-1/3/9, CD39, CD73, y receptores de adenosina) y al secretar citoquinas, como VEGF, TGF-β, IL-6, y M-CSF, que favorecen la angiogénesis. Además, las MDSCs, los macrófagos M2 y las DCs también pueden expresar moléculas inmunorreguladoras como la arginasa, iNOS, e IDO, y secretar citoquinas inmunosupresoras, como IL-10 y TGF-β, que pueden inhibir la proliferación de células T CD8+ o inducir su apoptosis. Las MDSC y las DC que expresan IDO también inducen la generación de células T reguladoras. IDO, arginasa, CD39 y CD73 son enzimas inmunorreguladoras. IDO cataboliza el triptófano a quineurina, la arginasa cataboliza L-arginina a ornitina y urea, y CD39 convierte ATP a AMP que puede ser luego metabolizado a adenosina por CD73. La adenosina se puede unir a receptores de adenosina, expresados en células tumorales, células endoteliales y células inmunitarias. Las células T, incluidas las Treg, pueden expresar receptores inhibitorios, como PD-1, CTLA-4, Tim-3 y LAG-3, que suprimen la respuesta inmune contra el cáncer y favorecen el crecimiento tumoral. En la fase de escape, el equilibrio está inclinado hacia la progresión del tumor principalmente debido a la presencia de citoquinas y moléculas inmunosupresoras, como las antes mencionadas. Figura tomada de *Mittal et al. 2014*.

prostaglandina E2, contribuyen al establecimiento de un microambiente inmunoregulator (Chow et al. 2012; Bhatia & Kumar 2011). Además, varias células del microambiente tumoral participan también de este fenómeno. Entre estas, se encuentran: las células T reguladoras, las células mieloides supresoras (MDSCs), macrófagos M2 asociados al tumor y células estromales (Vinay et

al. 2015).

Las células tumorales, y otras células del micorambiente tumoral, expresan una variedad de moléculas inmunosupresoras como TGF- β , IL-10, IDO, iNOS, ROS, arginasa y VEGF, las cuales suprimen directamente DCs o células T efectoras (**Figura 2.1.**) (Vinay et al. 2015). Las citoquinas TGF- β e IL-10 pueden inducir células inmunes con función inmunosupresora, como DCs reguladoras y Tregs. Las DCs reguladoras o tolerogénicas a su vez inducen células Tregs, lo cual amplifica la construcción de un microambiente tumoral inmunosupresor (Domogalla et al. 2017). Las células presentadoras de antígeno, reclutadas por el ambiente inmunoregulador del tumor, son entonces ideales para favorecer el remodelamiento del tejido y la sanación de heridas, pero no son efectivas para la inducción de respuestas antitumorales eficientes.

Otro mecanismo por el cual las células tumorales pueden regular la respuesta inmune es al aumentar la expresión de moléculas co-inhibidoras, como el ligando del receptor de muerte programada 1 (PD-L1) y CTLA-4 (Giuroiu & Weber 2017). Estas moléculas funcionan como señales de control inmune. Por ejemplo, la unión de PD-L1 a PD-1 en células T activadas resulta en la anergia de las células T o en la muerte de las mismas, reduciendo la actividad antitumoral y promoviendo el crecimiento del tumor. Se han reportado altos niveles de PD-L1 en células tumorales, así como células mieloides asociadas al tumor humanas, constituyendo un importante mecanismo de inmunoescape (Giuroiu & Weber 2017). Estos descubrimientos llevaron el desarrollo de estrategias terapéuticas de bloqueo del eje PD-1/PD-L1, que han sido exitosas en sobrepasar este mecanismo de tolerancia (Page et al. 2014). Las células tumorales también pueden inducir la apoptosis de células T efectoras de manera directa. Se ha reportado la expresión de Fas ligando (FasL) y la sobreexpresión de galectina-1, así como de TRAIL y RANTES, en células

transformadas, todas moléculas que serían capaces de inducir la apoptosis de células T específicas antitumorales (Vinay et al. 2015).

Como vimos, las células efectoras del sistema inmune se encuentran con varios mecanismos supresores mediados por las propias células tumorales, pero también deben enfrentar mecanismos mediados por células asociadas al tumor. Por ejemplo, las MDSCs pueden producir óxido nítrico, arginasa-1 y especies reactivas del oxígeno, los cuales son inmunosupresores (Shou et al. 2016). Los macrófagos asociados al tumor producen TGF- β y VEGF, que pueden inhibir tanto células T como células dendríticas (Ruffel et al. 2015). A su vez, células Treg activadas pueden producir IL-10 y TGF- β , que suprimen directamente a células T efectoras (Roychoudhuri et al. 2015). Las células Treg también pueden inhibir la expresión de moléculas de coestimulación como CD80 y CD86 en DCs locales, volviéndolas células presentadoras de antígeno tolerógenas. A su vez, cuando las células T se intentan activar, su propia producción de IFN- γ y otras citoquinas inflamatorias pueden aumentar la expresión de IDO y PD-L1 por células dendríticas, como mecanismo de contra regulación (Roychoudhuri et al. 2015).

La desregulación de la respuesta inflamatoria juega un rol central en el desarrollo del tumor, incluido su inicio, promoción, progresión, y metástasis, así como en la respuesta al tratamiento. El infiltrado inflamatorio puede mediar funciones tanto anti- como pro- tumorales. Esto último se explica por diferentes mecanismos. Por ejemplo, las células inflamatorias infiltrantes del tumor pueden favorecer su desarrollo a través de la inducción de angiogénesis, producción de mediadores inflamatorios que promueven la proliferación celular, o facilitando la metástasis al remodelar la matriz extracelular (Elinav et al. 2013). De hecho, ciertos infiltrados inflamatorios se han asociado a un mal pronóstico en pacientes con cáncer (Rusakiewicz et al. 2013).

Si bien hay consenso en cuanto a que existe un fuerte vínculo entre inflamación y cáncer, los inflamasomas, actores centrales de la inflamación, tienen roles contradictorios en múltiples facetas de la oncogénesis. Por un lado afectan positivamente vías autónomas de muerte celular en la célula cancerosa y potencian la inmunovigilancia tumoral, y por otro también estimulan procesos autócrinos y parácrinos que favorecen la inflamación carcinogénica, el crecimiento tumoral, la metástasis y la angiogénesis (Zitvogel et al. 2012; Kolb et al. 2014; Lin & Zhang 2017). En células presentadoras de antígeno los inflamasomas pueden estimular respuestas inmunes anti-tumorales. Además, la actividad de los inflamasomas aumenta la eficiencia de ciertos tipos de quimioterapias (Ghiringhelli et al. 2009).

El papel de los inflamasomas en el establecimiento o control de mecanismos inmunoreguladores en cáncer es poco comprendido. Esta ambigüedad en torno al rol de los inflamasomas y sus productos, altamente dependiente del contexto, dificulta llegar a un acuerdo en cuanto a si inhibir o activar el inflamasoma es beneficioso en relación a la terapia del cáncer, por lo cual ampliar el conocimiento en esta área sería ampliamente favorable y ayudaría a comprender esta intrincada relación entre el sistema inmunitario y el cáncer. Hoy en día está más que demostrado que estrategias que contrarrestan mecanismos de inmunoregulación establecidos por el tumor pueden ser de amplia utilidad clínica, y en este punto actores que participen de la respuesta inflamatoria pueden ser claves. Una situación fisiopatológica donde la biología del microambiente tumoral, la inflamación y el rol de la IL-1 β están poco caracterizados y podrían tener un papel relevante, es en la leucemia linfocítica crónica (LLC).

2.1.2. LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA (LLC)

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la leucemia más común entre los adultos en países occidentales. Se caracteriza por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B maduros clonales en médula ósea, sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos. La evolución de la enfermedad presenta un curso extremadamente variable, con rangos de supervivencia que van de meses a años. La edad media de diagnóstico se sitúa entre los 62 y 72 años con una incidencia mayor en hombres que en mujeres (Hallek 2015). La incidencia de la LLC varía con la composición étnica de la población estudiada, en nuestro país la tasa de incidencia anual oscila en el entorno de 4-5/100.000 habitantes/año en la población adulta, con una media etaria de 72 años y un rango de edad entre 35-90 años, con una relación 2:1 de hombres respecto a mujeres (Bezales et al. 2009). Estas tasas de incidencia son similares a las presentes en Europa Occidental.

Típicamente la LLC es detectada a través de un hemograma de rutina en ausencia de sintomatología. Para su diagnóstico es necesario que el individuo presente una linfocitosis de al menos $5 \times 10^9/L$, así como una población de células B clonales con un inmunofenotipo particular, portando entre otros el antígeno CD5 (Hallek et al. 2015). Han ocurrido grandes progresos en lo que refiere al tratamiento de la enfermedad, pudiendo obtenerse su remisión, sin embargo, los pacientes con frecuencia recaen, por lo cual se considera que permanece como incurable.

Una de las mayores dificultades que presenta el tratamiento de la LLC es su heterogeneidad clínica y molecular. El curso de la enfermedad es variable, pudiéndose distinguir por lo menos tres situaciones diferentes. Algunos pacientes permanecen indolentes para la enfermedad, mantienen un promedio de vida similar al del resto de la población y mueren por causas no ligadas a la misma. Otro grupo debuta con una enfermedad agresiva y tienen necesidad de tratamiento desde el momento del diagnóstico. Por último, otro tercio de los pacientes comienza con un periodo

indolente y por causas desconocidas entran en un período de agravación. Las principales estrategias de tratamiento se han centrado en disponer desde el diagnóstico de criterios que permitan evaluar el riesgo individual de progresión con el fin de determinar la estrategia terapéutica más adecuada.

Recientemente, se han hecho progresos en la identificación de marcadores biológicos que puedan predecir la progresión de la LLC. En particular, la expresión de genes no mutados de inmunoglobulinas, algunas anormalidades citogenéticas como las deleciones 17p y 11q y la expresión de la proteína 70 asociada a zeta (ZAP-70) se vinculan a un peor pronóstico (Bianchi et al. 2012). Existen dos sistemas de clasificación de riesgo, el sistema de Rai y el de Binet, donde los pacientes se clasifican mediante exámen físico y hemogramas en categorías, teniendo cada categoría una sobrevida asociada. El sistema propuesto por Binet en 1977 clasifica a los pacientes en tres categorías en función de su pronóstico: bueno, intermedio y severo (estadio A, B y C, respectivamente) (Binet et al. 1977).

Unos de los objetivos principales en el campo de la LLC es encontrar una explicación a la heterogeneidad en el pronóstico de la enfermedad, que pueda proporcionar indicios en cuanto al surgimiento de la misma y su progresión. Durante muchos años se creyó que a pesar de las diferencias en cuanto a la evolución de la enfermedad entre pacientes, esta se caracterizaba por la acumulación progresiva de linfocitos B en sangre periférica donde casi no existía proliferación tumoral. Hoy en día es claro que parte de las diferencias en cuanto al pronóstico está asociada a un delicado equilibrio entre poblaciones quiescentes y proliferantes del mismo clon leucémico en el mismo paciente (Chiorazzi 2007).

Por otra parte, en los últimos años el microambiente tumoral ha cobrado un protagonismo central en la LLC apareciendo como determinante en la evolución de la enfermedad y siendo el blanco de nuevas estrategias terapéuticas. Cuando linfocitos B leucémicos son colocados en cultivo experimentan apoptosis, sugiriendo el rol de señales presentes en el microambiente tumoral en la supervivencia y proliferación de las células leucémicas (Caligaris-Cappio et al. 2014). Si bien se está comenzando a comprender cuales son los genes, moléculas y células que están involucradas en la interacción con el microambiente y que papeles cumplen, todavía quedan por elucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales se promueve la acumulación/proliferación de las células tumorales.

Se considera que la inflamación estaría involucrada en el inicio y progresión de la LLC. La producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, acompañado por la activación intracelular de vías pro-inflamatorias, sugieren que la inflamación crónica contribuye a la fisiopatología y sintomatología de la LLC. La activación del proceso inflamatorio crónico, característicamente encontrado en LLC, proporciona a las células tumorales ventajas en cuanto a su supervivencia y estimula el clon leucémico. La activación constitutiva de reguladores pro-inflamatorios intracelulares como NF- κ B y STAT3 contribuye con esta inflamación crónica mediante la inducción de citoquinas inflamatorias como la IL-6, cuyas actividades están potenciadas por el diálogo entre las células de LLC y su microambiente, resultando en las anomalías cualitativas y cuantitativas encontradas en la enfermedad (Rozovski et al. 2013).

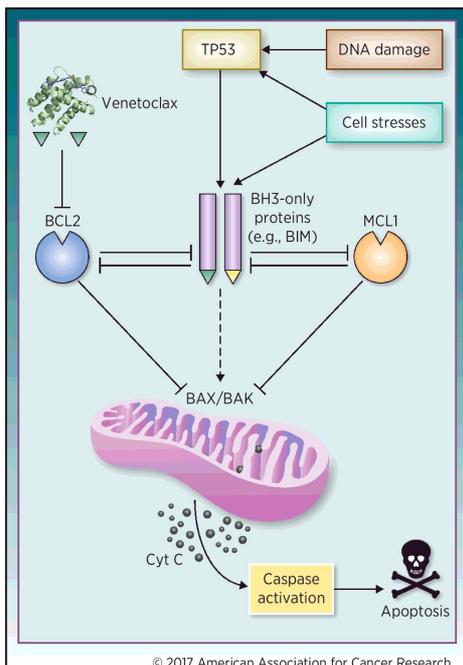
El estudio de los mecanismos involucrados en la inflamación asociada a la LLC son importantes en la comprensión de la enfermedad y la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Si bien parece existir un consenso en cuanto a que mayor inflamación determina un peor pronóstico, el rol de los

inflammasomas en esta enfermedad es desconocido y la IL-1 β aparece como controversial en la literatura, con trabajos que de manera contra-intuitiva sugieren que niveles bajos de esta potente citoquina proinflamatoria en sangre periférica se vincularía a un peor pronóstico (Yan et al. 2011). En lo que refiere al balance entre proliferación y muerte celular, aspecto determinante en el curso de la enfermedad, se sabe que la células de LLC son resistentes a la apoptosis, pero otras formas de muerte se encuentran poco exploradas.

La resistencia a la apoptosis es una de la características principales del cáncer, y en varios tipos de tumores existe una sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas, lo que además de sostener la supervivencia del clon maligno impacta en la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (Hanahan & Weinberg 2011). La familia de proteínas BCL2 tienen un rol central en la regulación de la muerte celular, y BCL2 (B-cell lymphoma 2) fue el primer gen anti-apoptótico descubierto (Tsujimoto et al. 1985). En cáncer, la proteína anti-apoptótica BCL2 es sobreexpresada a través de diversos mecanismos y en LLC esto es común a la gran mayoría de los pacientes. En la

Figura 2.2. Apoptosis y mecanismo de acción del Venetoclax.

Esta figura muestra las interacciones clave entre las moléculas que regulan la vía mitocondrial de la apoptosis, y muestra cómo el venetoclax induce este proceso al actuar como un mimético de BH3 capaz de inhibir BCL2. La apoptosis se produce cuando BAX y BAK se activan, esto lleva a la despolarización de la membrana mitocondrial externa, la liberación de citocromo C y la activación de caspasas, que finalmente destruyen la célula. En células sanas, BAX y BAK se mantienen en un estado inactivo a través de la inhibición por BCL2 y proteínas similares (incluyendo MCL1 y BCLxL). La represión de BAX y BAK se libera por la acción de las proteínas solo BH3 (incluidas BIM, BAD, PUMA y PMAIP1) cuando las células sufren un estrés grande, como el daño al ADN. Las células de la LLC mantienen altos niveles de BCL2, y la expresión de MCL1 y BCLxL aumenta cuando son estimuladas por factores de crecimiento ambientales, como el CD40 ligando, por lo que estas células tienen una capacidad disminuida de activar la apoptosis. El venetoclax actúa como un imitador de proteínas solo BH3, uniéndose a BCL2, y permitiendo así la activación de BAX para iniciar la apoptosis. Figura tomada de *Roberts et al. 2017*.



LLC la alteración citogenética más común es

la delección 13q14, dentro de la región mínima deletada se encuentra los microARNs 15 y 16 represores de BCL2 (Cimmino et al. 2005). Además, la hipometilación de BCL-2 debido a desregulaciones epigenéticas también contribuye a su sobreexpresión (Cahill et al. 2013).

La muerte celular depende del balance entre proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas. Las moléculas anti-apoptóticas como BCL2, MCL-1 y BCLxL, evitan la cascada apoptótica en células sanas al mantener bajo control proteínas activadoras y efectoras como BAK y BAX. La apoptosis se previene por la formación de heterodímeros mediante la unión de dominios BH3 presentes en las proteínas pro-apoptóticas a depresiones hidrofóbicas presentes en las proteínas anti-apoptóticas. Cuando las células ya no son necesarias, o sufren un estrés significativo, la muerte por apoptosis se inicia debido a la activación de proteínas solo BH3 (por ej. BIM, PUMA, BAD), antagonistas naturales de las proteínas anti-apoptóticas. Cuando esto sucede, las proteínas solo BH3 se unen a las depresiones presentes en las proteínas anti-apoptóticas y las proteínas BAK y BAX quedan libres para dirigir la muerte celular, lo que logran al inducir daño mitocondrial. Dado que la unión de proteínas BH3 único, como BIM, a BCL2 es un paso clave para iniciar la apoptosis, moléculas pequeñas capaces de mimetizar su acción fueron desarrolladas para inhibir farmacológicamente a proteínas anti-apoptóticas (**Figura 2.2.**).

El Venetoclax (ABT-199) es una nueva molécula pequeña que actúa como un inhibidor potente y selectivo de la proteína BCL2. Es utilizada en la clínica mostrando una alta eficiencia y seguridad en el tratamiento de la LLC, y con resultados preliminares prometedores en la leucemia mieloide aguda (AML) y la leucemia linfoblástica aguda (ALL). En base a un ensayo clínico de una rama que mostró una tasa de respuesta del 79%, remisión total en el 20% de los casos, y una supervivencia libre de progresión al año estimada en 72%, la FDA y la EMA lo aprobaron en el 2016 para pacientes con

LLC previamente tratada y delección 17p13, así como pacientes que fallaron en el tratamiento con inhibidores de la señalización del receptor de célula B (sólo EMA)(Deeks 2016). Las delecciones en el brazo corto del cromosoma 17 (17p) son un potente marcador de mayor tendencia a la recaída y menor supervivencia en estos pacientes.

Los resultados más sorprendentes e impresionantes del venetoclax incluyen la rápida inducción de la apoptosis en células leucémicas y una drástica reducción de la carga tumoral a las pocas horas luego de la administración. Como mencionamos antes, BCL2 reprime la activación de BAX y BAK, el venetoclax actúa como un mimetizador de BH3 uniéndose específicamente a BCL2, esto permite la activación y translocación de BAX y BAK a la membrana externa de la mitocondria induciendo la liberación de citocromo C por depolarización y la posterior activación de caspasas, siendo este el principal modo de acción propuesto para esta droga (Roberts et al. 2017). Además, la unión del venetoclax libera a proteínas solo BH3, que estaban unidas a BCL2, las cuales pueden ahora unirse a otras proteínas anti-apoptóticas como MCL1, mejorando el efecto global.

En este trabajo nos propusimos explorar la función de TMEM176A y B en las células de LLC, regulando el proceso inflamatorio y la muerte celular. Además, evaluamos la acción de una droga inhibidora de la función de TMEM176A en combinación con el Venetoclax, una molécula que, como vimos anteriormente, ha mostrado excelentes resultados en la clínica para el tratamiento de la LLC.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la expresión de TMEM176A y B en muestra de PBMCs de pacientes con LLC indolente y progresiva
- Estudiar la activación del inflamasoma y la muerte por piroptosis en células de LLC
- Evaluar la capacidad de TMEM176A de regular la activación del inflamasoma y la muerte de las células leucémicas
- Determinar si la inhibición farmacológica de TMEM176A, sola o en conjunto con el Venetoclax, podría ser una buena estrategia terapéutica en la LLC

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Muestras humanas

Se trabajó con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas a partir de muestras de sangre de pacientes con LLC y donantes sanos. Las PBMCs de pacientes con LLC se obtuvieron del banco de células de pacientes del Laboratorio de Investigación en LLC del Institut Pasteur de Montevideo y las PBMCs de donantes sanos fueron gentilmente proporcionadas por la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo. Se dispuso de un seguimiento clínico de los pacientes lo que permitió dividirlos, a partir de criterios clínicos y marcadores moleculares, entre aquellos con enfermedad indolente o progresiva.

2.3.2. Western Blot anti-TMEM176A de lisados de PBMCs de pacientes con LLC

Se generaron lisados celulares a partir de PBMCs de pacientes con LLC, para esto se resuspendió un pellet seco de estas células en buffer RIPA con 0.1% de SDS e inhibidor de proteasas (Pierce), y a continuación se sonicaron las muestras. 50 µg de proteína fueron migrados por electroforesis en un gel de poliacrilamida 10% a 150 V, en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Previo al sembrado, las muestras se diluyeron en buffer de carga (β -mercaptoetanol 25%, SDS 2.5%, Glicerol 50%, Buffer Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, Azul de bromofenol 0.1 mg/mL) y se calentaron a 100 °C por 10 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Luego se realizó una electrotransferencia semi-seca a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL de 0,45 µm a 20 V por 30 minutos. La membrana se bloqueó con una solución de TBS-Leche en polvo 5% 3 h y a continuación se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo anti-TMEM176A (Proteintech Group Cat. No: 20378-1-AP) a una concentración de 1,43 µg/mL O.N. a 4 °C diluido en TBS-Tween 20 0,1%-Leche en polvo 5%. Al otro día se lavó la membrana y se incubó durante 1 h a

TA con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa a una concentración de 0,27 µg/mL diluido en TBS-Tween 20 0,1%-Leche en polvo 5%. Luego se lavó la membrana nuevamente y se reveló con ECL (SuperSignal West Pico, Thermofisher Scientific). Cuando fue requerido, las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Image J y se normalizaron a la proteína de expresión constitutiva gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), a partir de la cuantificación de las bandas obtenidas en un Western Blot anti-GAPDH, luego del stripping de la membrana.

2.3.3. Western Blot anti-GAPDH

Se realizó el stripping de las membranas previamente utilizadas para los Western Blots anti-TMEM176A o anti-GSDMD incubándolas con guanidina 7 M por 15 minutos. Se lavó la membrana y se bloqueó por 1 h con TBS-Leche en polvo 5%, luego se incubó por 1 h con un anticuerpo anti-GAPDH (Sigma, Cat. Nro. G9545) a 0.2 µg/mL diluido en TBS-Tween 20 0,1%-Leche en polvo 5%. Se lavó y se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma) diluido en TBS-Tween 20 0,1%-Leche en polvo 5% por 1 h. Luego se lavó la membrana nuevamente y se reveló con ECL (SuperSignal West Pico, Thermofisher Scientific). Las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Image J y se utilizaron para normalizar los restantes Western Blots.

2.3.4. Inmunofluorescencia anti-TMEM176A en PBMCs de LLC

Se colocaron PBMCs de LLC recién descongeladas y fijadas en PFA 4% en portaobjetos tratados previamente con Poli-L-Lisina 0.01% (Sigma) y se dejaron adherir por una hora a TA. Se realizó el bloqueo y permeabilización de las células por 15 minutos utilizando una solución de PBS-BSA 3%-Tritón X-100 0.1% y luego se las incubó por 1 h con el anticuerpo policlonal de conejo anti-

TMEM176A (Proteintech Group Cat. No: 20378-1-AP) a 28.6 µg/mL diluido en PBS-BSA 3%-Tritón X-100 0.1%. Se lavaron y se incubaron 1 h con un anticuerpo secundario anti-conejo-Cy5 y un anticuerpo anti-IgM-Cy3, diluidos en PBS-BSA 3%-Tritón X-100 0.1%. Luego se lavaron nuevamente, se las incubó con DAPI a 1 µg/mL en PBS durante 5 minutos y se montaron en Glicerol 80%-Tris 0.1 M pH 8. Las láminas se observaron utilizando el microscopio confocal Leica DMI6000, TCS-SP5.

2.3.5. Purificación a partir de PBMCs de células CD19+ por separación celular activada por magnetismo (MACS)

A partir de PBMCs de pacientes con LLC se realizó la purificación de células CD19+ por selección positiva utilizando el sistema de MACS. Las células se incubaron con un volumen apropiado de microbeads anti-CD19 humano (Miltenyi Biotec, 130-050-301) 15 minutos a 4 °C, se lavaron y se procedió a la separación magnética utilizando columnas LS. Se separó una alícuota de células pre-purificación y de las fracciones CD19+ y CD19- para evaluar la eficiencia de la separación. Para esto se marcaron las distintas fracciones con un anticuerpo anti-IgM-PE 1/40 y un anti-CD5-APC 1/20 diluidos en PBS por 30 minutos a 4 °C. Se lavaron las células y se adquirieron en el citómetro Cyan ADP (DAKO). El análisis se realizó utilizando el software FlowJo. Las fracciones CD19+ obtenidas estaban enriquecidas en más un 99 % de células IgM+CD5+.

2.3.6. Evaluación de caspasa-1 activa y viabilidad celular mediante citometría de flujo

Se evaluó la activación de caspasa-1 en células IgM provenientes de PBMCs de pacientes con LLC, o donantes sanos, criopreservadas, al momento del descongelado, 24, 48 y 72 hs luego de permanecer en cultivo y frente a distintos tratamientos. En todos los casos esto se realizó mediante citometría de flujo utilizando una sonda FLICA (Fluorescent Labeled Inhibitors of CASpases) específica para la detección de caspasa-1 activa: 660-YVAD-FMK (Immunochemistry,

Cat. Nro. 9122). Las células se incubaron, protegidas de la luz, por 30 minutos a 37 °C con la sonda 660-YVAD-FMK diluida 1/250 en PBS (se partió de una solución stock de 50 µL por vial en DMSO), luego se lavaron con el buffer de lavado provisto en el kit y se procedió al marcado de IgM de membrana. Para esto las células se incubaron con un anticuerpo anti-IgM-PE a 1/40 diluido en PBS-BSA 3%-EDTA por 30 minutos en hielo y transcurrido este tiempo se lavaron nuevamente. En los casos donde se evaluó la viabilidad celular se agregó DAPI a 1 µg/mL, como marcador de permeabilización de la membrana celular, inmediatamente antes de la adquisición en el citómetro. Las muestras se adquirieron en los citómetros AccuriC6 (BD) o FACSArea FusionIII (BD). El análisis se realizó utilizando el software FlowJo.

2.3.7. Marcado de inmunofluorescencia de Caspasa-1 activa en PBMCs de LLC

PBMCs de pacientes con LLC se incubaron, protegidas de la luz, por 30 minutos a 37 °C con la sonda 660-YVAD-FMK diluida 1/250 en PBS, para marcar caspasa-1 activa, luego se lavaron con el buffer de lavado provisto en el kit y se fijaron por 10 minutos con PFA 4%. Las células fijadas se dejaron adherir por 1 h a portaobjetos tratados con Poli-L-Lisina 0.01% (Sigma). Se lavaron y se incubaron 1 h con un anticuerpo anti-IgM-Cy3, diluido en PBS-BSA 3%-Tritón X-100 0.1%. Luego se lavaron nuevamente, se las incubó con DAPI a 1 µg/mL en PBS durante 5 minutos y se montaron en Glicerol 80%-Tris 0.1 M pH 8. Las láminas se observaron utilizando el microscopio confocal Leica DMI6000, TCS-SP5.

2.3.8. Western Blot anti-GSDMD

Se realizó un Western Blot anti-GSDMD de células CD19+ purificadas por MACS a partir de PBMCs o PBMCs totales (con diferentes tiempos de cultivo y frente a distintos tratamientos) de pacientes con LLC. Se generaron lisados celulares a partir de pellets secos resuspendidos en buffer RIPA con

0.1% de SDS e inhibidor de proteasas (Pierce), y a continuación sonicados. 50 µg de proteína fueron migrados por electroforesis en un gel de poliacrilamida 10% a 120V, en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) fue utilizado como marcador de peso molecular. Previo al sembrado, las muestras se diluyeron en buffer de carga (β-mercaptoetanol 25%, SDS 2.5%, Glicerol 50%, Buffer Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, Azul de bromofenol 0.1 mg/mL) y se calentaron a 100 °C por 10 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Luego se realizó una electrotransferencia semi-seca a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL de 0,45 µm a 20 V por 30 minutos. Se verificó la presencia de proteínas por tinción con Rojo Ponceau. La membrana se bloqueó con una solución de TBS-BSA 3% por 2 h y a continuación se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo anti-GSDMD (Novus, Cat. No: NBP2-33422) a una concentración de 0.4 µg/mL diluido en TBS-Tween 20 0,1%-BSA 1%, O.N. a 4 °C . Al otro día se lavó la membrana y se incubó durante 1 h a TA con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma) a una dilución 1/2500 diluido en TBS-Tween 20 0,1%-BSA 1%. Luego se lavó la membrana nuevamente y se reveló con ECL.

2.3.9. Cultivo de PBMCs de pacientes con LLC

PBMCs aisladas a partir de sangre periférica de pacientes con LLC criopreservadas se descongelaron y se realizó el cultivo de las mismas por 6, 24, 48 o 72 h en medio RPMI complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 µg/ml, estreptomycin 100 µg/ml, amortiguador HEPES 1%, aminoácidos no esenciales 1% (v/v) y piruvato de sodio 1% (v/v). Se mantuvieron en atmósfera húmeda a 37 °C y 5% de CO₂.

2.3.10. Evaluación de la muerte celular espontánea de células B de LLC en cultivo

1x10⁶ PBMCs de pacientes con LLC fueron cultivadas en placas de 96 pocillos, en las condiciones descritas anteriormente por 24, 48 o 72 h. Transcurrido ese tiempo se guardaron los sobrenadantes de cultivo, se recuperaron las células y se determinó la activación de caspasa-1 y la viabilidad celular por citometría de flujo, como se describió anteriormente. Para evaluar el clivado de gasdermina mediante Western Blot se obtuvieron pellets celulares a partir de 5x10⁶ PBMCs de pacientes de LLC colocadas en placa de 24 pocillos por 24, 48, 72 h y de células recién descongeladas (0 h). La medida de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de cultivo se realizó utilizando el kit Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.3.11. Inhibición de caspasa-1 en PBMCs de LLC

1x10⁶ PBMCs de pacientes con LLC fueron cultivadas en placas de 96 pocillos en presencia del inhibidor de caspasa-1 Ac-YVAD-CMK (Santa Cruz Biotechnology, Cat. Nro. CAS 178603-78-6) a 200 µM o el equivalente de DMSO por 24 hs, o a 500 µM o el equivalente de DMSO por 48 hs. Transcurrido ese tiempo se guardaron los sobrenadantes de cultivo, se recuperaron las células y se determinó la activación de caspasa-1 y la viabilidad celular por citometría de flujo, como se describió anteriormente.

2.3.12. Silenciamiento de TMEM176A en PBMCs

Se colocó siRNA a 50 nM final junto con 5 µL de lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) en 0,25 ml de medio RPMI sin complementar por 20 minutos. Luego se agregaron 1x10⁶ células de LLC en 0,75 ml de medio RPMI completo sin antibiótico y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ por 48hs. Los siRNA para TMEM176A y control se co-transfectaron junto con un siRNA irrelevante fluorescente conjugado a FAM. La eficiencia de transfección se evaluó mediante citometría de flujo.

El silenciamiento de TMEM176A se evaluó mediante inmunofluorescencia. Se realizó el marcado de TMEM176A e IgM, como se describió anteriormente. La intensidad de fluorescencia de TMEM176A se cuantificó en al menos 50 células IgM+FAM-siRNA+ que presentaban el siRNA para TMEM176A o siRNA control utilizando un macro en el programa FIJI. 48 hs luego de la transfección se evaluó la activación de caspasa-1 por citometría de flujo como se describió anteriormente.

2.3.13. Evaluación de la muerte celular inducida por el (+)-BayK8644 sobre células B de LLC

1×10^6 PBMCs de pacientes con LLC fueron cultivadas en placas de 96 pocillos con (+)-BayK8644 a $50 \mu\text{M}$ o el equivalente de EtOH (Vehículo) por 24 hs. En otra condición, se colocaron las células en presencia de (+)-BayK8644 $50 \mu\text{M}$ y el inhibidor de caspasa-1 Ac-YVAD-CMK (Santa Cruz Biotechnology, Cat. Nro. CAS 178603-78-6) a $200 \mu\text{M}$ o el equivalente de vehículo de ambos. Transcurrido este tiempo se guardaron los sobrenadantes de cultivo, se recuperaron las células y se determinó la activación de caspasa-1 y la viabilidad celular por citometría de flujo, como se describió anteriormente.

2.3.14. Evaluación de la muerte celular inducida por el tratamiento combinado de (+)-BayK8644 y Venetoclax sobre células B de LLC

1×10^6 PBMCs de pacientes con LLC fueron cultivadas en placas de 96 pocillos con (+)-BayK8644 a $50 \mu\text{M}$ o el equivalente de EtOH (Vehículo) por 20 hs. Transcurrido este tiempo se agregó Venetoclax a 10 nM o el equivalente de DMSO del mismo. Luego de este tiempo se guardaron los sobrenadantes de cultivo, se recuperaron las células y se determinó la activación de caspasa-1 y la viabilidad celular por citometría de flujo, como se describió anteriormente.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Expresión de TMEM176A en células B de LLC

Para estudiar un posible rol de TMEM176A y TMEM176B en la LLC, se analizó por WB la expresión de estas proteínas en lisados celulares generados a partir de PBMCs de pacientes con un diagnóstico típico de LLC (score Matutes de 4 o 5). De acuerdo a criterios clínicos, los pacientes se dividieron en dos grupos: un grupo de 7 individuos con enfermedad indolente, y un grupo de 7 individuos con enfermedad progresiva, caracterizados, estos últimos, por una mayor linfocitosis, una enfermedad más agresiva, y necesidad de tratamiento.

La expresión de ambas proteínas fue cuantificada por densitometría a partir de las bandas de WB utilizando el programa Image J y normalizada a los valores obtenidos para la enzima gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína de expresión constitutiva. Se compararon los ratios TMEM176A/GAPDH y TMEM176B/GAPDH entre el grupo progresor e indolente encontrándose diferencias significativas en la expresión de TMEM176A entre ambos, siendo su expresión mayor en las muestras procedentes de pacientes con enfermedad progresiva (**Figura 2.3.**). No se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de TMEM176B entre ambos grupos, por lo que se continuó trabajando exclusivamente con TMEM176A (**Figura S4.1.**).

En base a este resultado nos propusimos, en primer lugar, determinar si eran las células B leucémicas las que expresaban TMEM176A. Para esto se realizaron dos abordajes experimentales, por un lado, se estudió la presencia de TMEM176A en células IgM+ mediante inmunofluorescencia, y por otro se realizó un WB para la proteína sobre un lisado de células B de LLC. El marcado de inmunofluorescencia para TMEM176A mostró claramente la expresión de esta proteína en las células IgM+ de sangre periférica de pacientes con LLC, como se observa en la

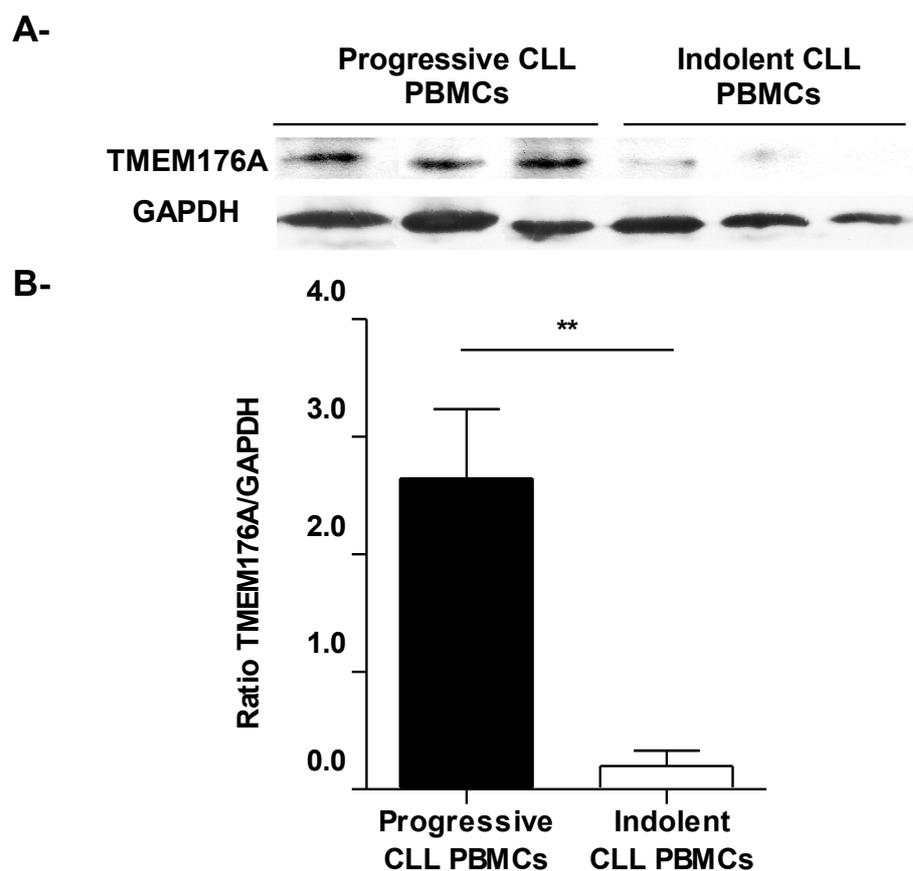


Figura 2.3. Expresión de TMEM176A en PBMCs de LLC. **A-** Se realizó un Western Blot para detectar la presencia de TMEM176A en lisados celulares de PBMC aisladas de individuos con LLC. De acuerdo con los datos clínicos los individuos fueron clasificados como indolentes o progresores para la enfermedad. La figura es representativa de lo encontrado al analizar 14 muestras (7 de pacientes clasificados como indolentes y 7 de progresores). La proteína de expresión constitutiva GAPDH fue utilizada como control. **B-** Se determinó la expresión de TMEM176A relativa a GAPDH para cada una de las muestras analizadas en ambos grupos. La cuantificación de las bandas de WB fue realizada utilizando el programa Image J. Se encontró una expresión significativamente mayor de TMEM176A en el grupo de muestras de PBMCs provenientes de pacientes con enfermedad progresiva. ** $p < 0,0095$, test de Mann Whitney U.

Figura 2.4-A, con un patrón de marcado fuera del núcleo y más bien puntiforme. Dado el tamaño pequeño de estas células y su citoplasma escaso es difícil determinar, sin marcadores más específicos, cual podría ser la localización subcelular exacta de TMEM176A.

Se realizó, por otra parte, la purificación por selección positiva, utilizando separación celular activada por magnetismo (MACS), de células CD19+ a partir de PBMCs de pacientes con LLC. Se obtuvieron valores de pureza por encima del 99% y se determinó, por citometría de flujo, que estas células CD19+ purificadas correspondían en su totalidad a la población tumoral, caracterizada

por el fenotipo IgM+CD5+ (**Tabla S4.1.**). Se realizó un WB para TMEM176A a partir de un lisado de las células B leucémicas purificadas, el cual mostró una expresión positiva de nuestra proteína de interés (**Figura 2.4-B**). El lisado celular de PBMCs de un paciente con LLC, previamente analizado para su expresión de TMEM176A, se utilizó como control positivo.

De estos resultados podemos concluir, entonces, que las células tumorales de pacientes con LLC expresan TMEM176A, y que habría una mayor expresión de TMEM176A en PBMCs de pacientes

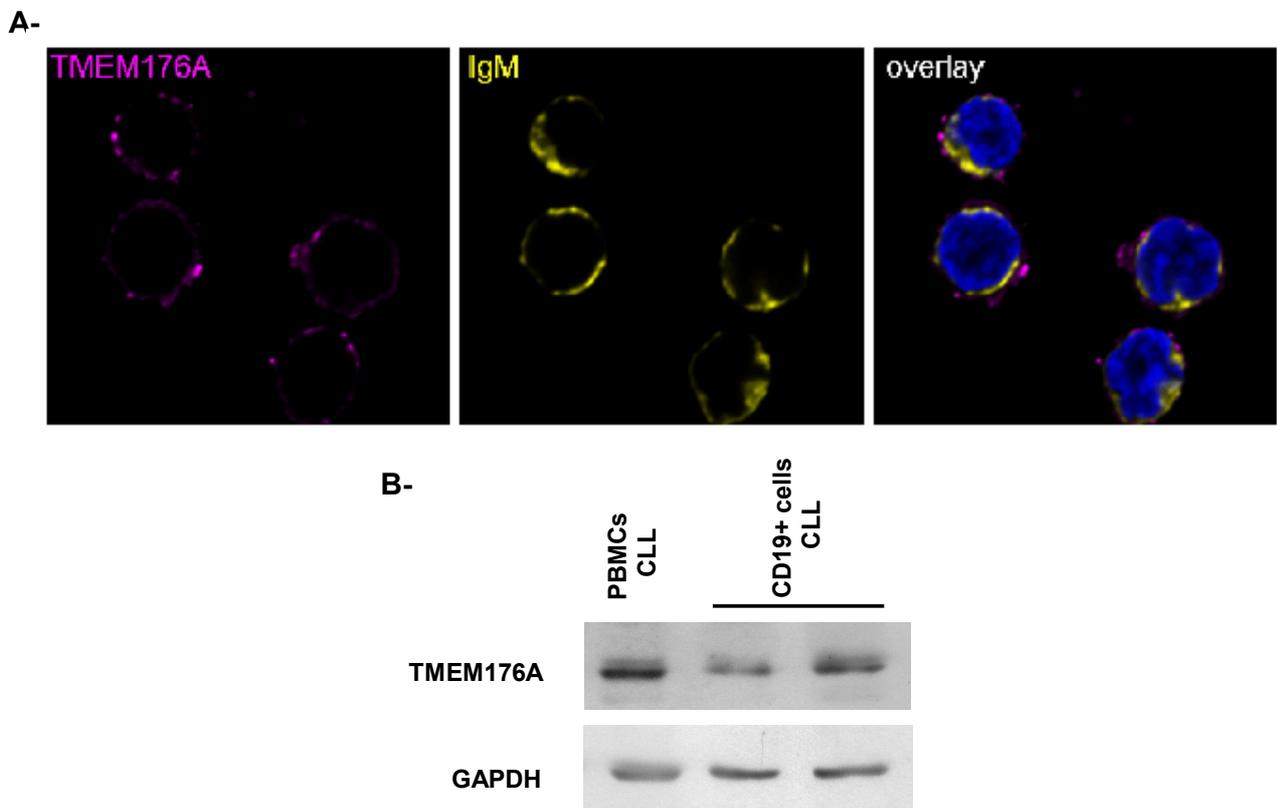


Figura 2.4. Expresión de TMEM176A en células B de LLC. **A-** Se detectó la expresión de TMEM176A en células B IgM+ de sangre periférica de pacientes con LLC por inmunofluorescencia. Magenta: TMEM176A, amarillo: IgM y azul: DAPI. Aumento 60X, con lente de inmersión en aceite. Microscopio confocal Leica DMI6000, TCS-SP5. **B-** Se confirmó la expresión de TMEM176A en células B leucémicas mediante Western Blot. Se partió del lisado de células CD19+ purificadas a partir de PBMCs de pacientes con LLC por la técnica de MACS, con un enriquecimiento del 99% en células B leucémicas (IgM+CD5+). El lisado de PBMCs de un paciente con LLC encontrado como positivo para TMEM176A por Western Blot anteriormente se utilizó como control positivo. La proteína de expresión constitutiva GAPDH se utilizó como control de carga.

con LLC progresiva. Resultados de nuestro grupo de trabajo postulan a TMEM176A como un nuevo regulador del inflamasoma, en este sentido, a continuación nos propusimos estudiar la activación del inflamasoma en las células B presentes en sangre periférica de pacientes con LLC.

2.4.2. Activación de Caspasa-1 en células B de pacientes con LLC

Como se mencionó anteriormente, uno de los pasos claves y determinantes en la activación del inflamasoma es el clivado de la pro caspasa-1 a su forma activa. Una de las formas de evaluar esto experimentalmente es utilizando la sonda fluorescente FLICA 660-YVAD-FMK. Esta sonda consiste en un péptido que se une de forma irreversible a la forma activa de caspasa-1, el cual está conjugado a su vez a un fluoróforo, lo que marca las células que activaron caspasa-1 y permite evaluarlas por citometría de flujo o inmunofluorescencia. Utilizamos esta sonda para evaluar la presencia de caspasa-1 activa en células B provenientes de muestras de PBMCs criopreservadas de pacientes con LLC indolente y progresiva, y de donantes sanos, por citometría de flujo. Las células se seleccionaron primero por morfología, descartando aquellas con un fenotipo compatible con células muertas y debris celulares, también se descartaron dobletes, y por último se evaluó el porcentaje de células con caspasa-1 activa (660-YVAD-FMK+) dentro de la población de células B, determinadas como IgM positivas (IgM+) (**Figura 2.5-A**).

Comparado con los donantes sanos los pacientes con LLC mostrarán un porcentaje menor de células B con caspasa-1 activa, y, dentro de estos, los pacientes con LLC progresiva presentaron un porcentaje significativamente menor de células B con caspasa-1 activa que aquellos con enfermedad indolente (**Figura 2.5.B**). Cabe destacar que se realizaron ensayos utilizando PBMCs frescas, sin el proceso de criopreservación, y se obtuvieron los mismos resultados. Las PBMCs de pacientes con LLC marcadas para IgM y caspasa-1 activa se observaron por microscopía de

inmunofluorescencia, confirmándose la presencia de caspasa-1 activa en células B, y observándose un patrón de marcado de caspasa-1 en forma de punto, ampliamente descrito como característico de la activación del inflammasoma (**Figura 2.5.C**).

Para ahondar más en la activación de inflammasoma en las células B de pacientes con LLC, se procedió al co-marcado de caspasa-1 con la proteína sensora NLRP3, resultados aún no del todo

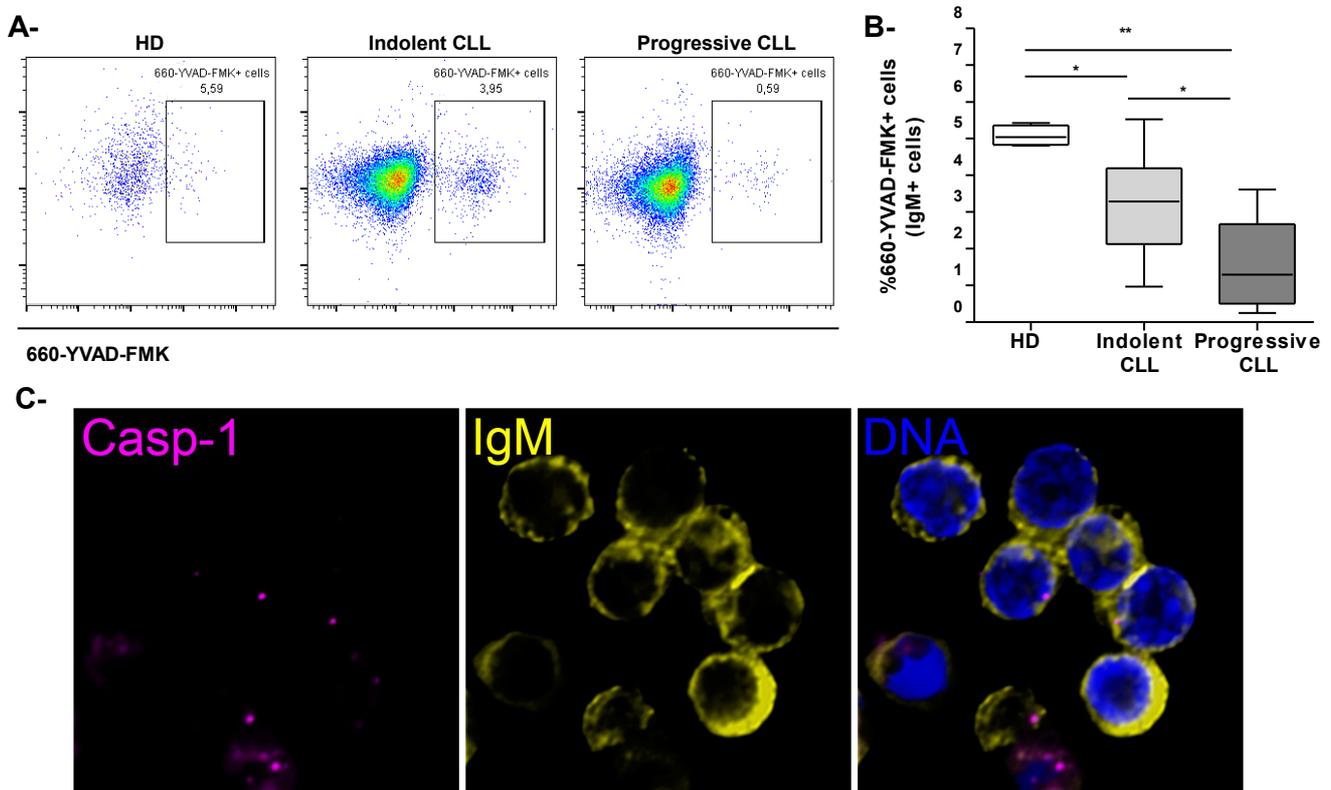


Figura 2.5. Presencia de caspasa-1 activa en células B de LLC. **A-** Se estudió la presencia de caspasa-1 activa en células B IgM+ de sangre periférica de pacientes con LLC con enfermedad indolente o progresora y donantes sanos mediante citometría de flujo, utilizando la sonda FLICA 660-YVAD-FMK. **B-** Se determinó el porcentaje de células IgM+ positivas para caspasa-1 activa en cada uno de estos grupos. Se utilizaron PBMCs provenientes de 5 donantes sanos, 13 pacientes con LLC indolente, y 13 con LLC progresora. * p<0.05, ** p<0,01 t test. **C-** Se observó mediante inmunofluorescencia la presencia de caspasa-1 activa en células IgM+ de LLC, observándose un marcado en forma de punto correspondiente con lo previamente descrito para la formación del complejo del inflammasoma. Magenta: Caspasa-1 activa, amarillo: IgM y azul: DAPI. Aumento 60X, con lentes de inmersión en aceite. Microscopio confocal Leica DMI6000, TCS-SP5.

concluyentes parecen indicar una colocalización de ambas proteínas, señalando al inflammasoma

Nlrp3 como un fuerte candidato a ser el activado en este contexto (**Figura S4.2.**).

Nuestros resultados indicarían la presencia en sangre periférica de una pequeña población de células B IgM+ con activación de caspasa-1, y una disminución de la misma en los pacientes con LLC progresiva comparado con aquellos con enfermedad indolente. Esto podría ser coherente con la expresión aumentada de TMEM176A, un regulador negativo de la activación del inflamasoma, encontrada antes para el grupo progresor. Las consecuencias conocidas de la activación del inflamasoma en una células son principalmente dos: la liberación de la forma activa de las citoquinas IL-1 β e IL-18, y la muerte celular por piroptosis. En una primera instancia nos propusimos estudiar que ocurría con la muerte por piroptosis en estas células, ya que si bien está ampliamente establecido que las células leucémicas son resistentes a la apoptosis, no se conoce en profundidad que ocurre con otros tipos de muerte celular.

2.4.3. Clivado de Gasdermina D en células B de LLC

Como se mencionó en la introducción, el paso final y determinante de la muerte celular por piroptosis es el clivado de la proteína Gasdermina D (GSDMD) por acción de la caspasa-1, para liberar su porción N-terminal de una región inhibidora interna. Una vez liberado, este péptido N-terminal puede insertarse en la membrana y formar poros, lo que provocaría la lisis osmótica de la célula con liberación del contenido interno. Para evaluar si las células B leucémicas experimentarían este tipo de muerte realizamos un WB anti-GSDMD a lisados de células B de pacientes con LLC. Las células fueron purificadas por MACS a partir de PBMCs.

En este punto encontramos que, efectivamente, se puede distinguir la presencia de GSDMD en su forma completa (GSDMD FL), lo cual es esperable ya que se trata de una proteína de expresión

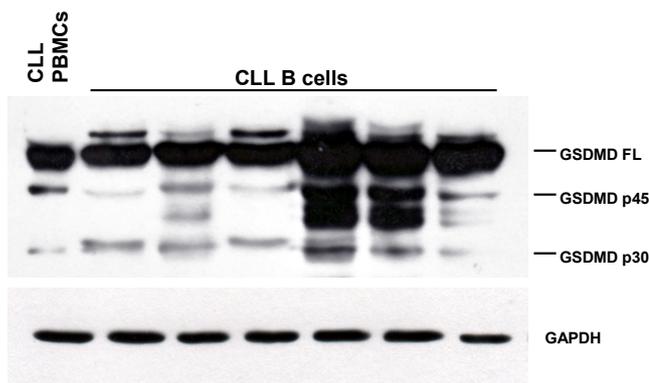


Figura 2.6. Presencia de gasdermina D en células B de LLC. A partir del lisado de células CD19+ purificadas de PBMCs de pacientes con LLC indolente y progresiva se realizó un WB anti-gasdermina D, como se puede observar se detectó la presencia de la forma “full length” así como de los productos de clivado p45 y p30. Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga.

relativamente ubicua, pero también se distinguen dos formas de clivado: una de aproximadamente 45 kDa (GSDMD p45) y otra de unos 30 kDa (GSDMD p30), esta última descrita como producto del corte de la GSDMD por acción de caspasa-1 (**Figura 2.6.**). La forma de aproximadamente 30 kDa ha sido identificada como la región N-terminal responsable de la formación de poros en la membrana y, por ende, la ejecutora principal de la muerte piroptótica.

Este resultado nos lleva a postular que una de las consecuencias de la presencia de caspasa-1 activa en las células B de LLC podría ser dirigir a las mismas hacia la muerte por piroptosis. El control de la activación de esta caspasa podría representar, entonces, un punto de control importante para la supervivencia del clon tumoral.

2.4.4. Muerte de PBMCs de LLC en cultivo por piroptosis

Dado nuestro hallazgo previo de que las células de LLC serían capaces de activar el inflammasoma, y una de las consecuencias de esto sería la muerte celular por piroptosis, nos propusimos evaluar si la misma efectivamente ocurría en un modelo *in vitro*. Está ampliamente establecido que las células de LLC puestas en cultivo, sin señales de supervivencia o soporte de otras células, experimentan una rápida muerte celular. Si bien esta se ha atribuido a una muerte por apoptosis,

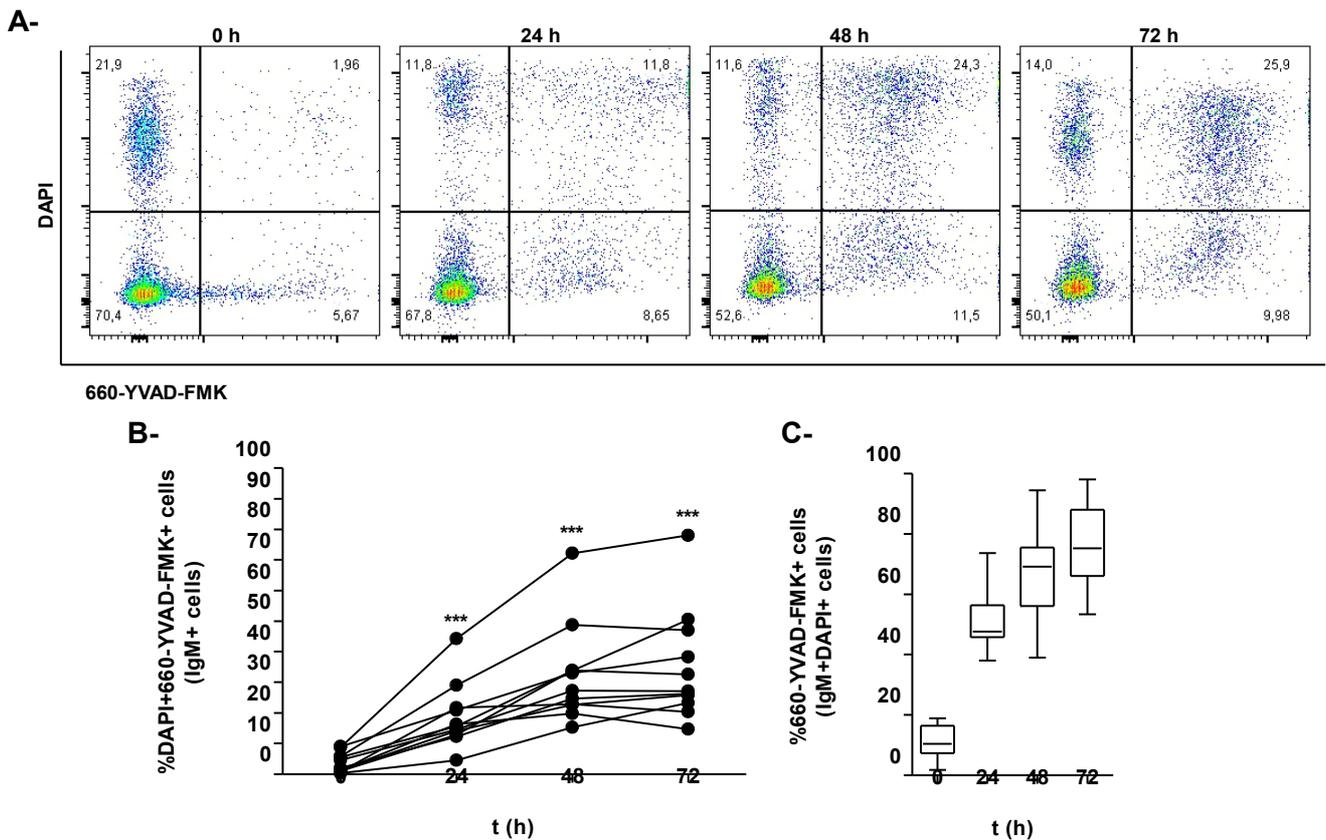


Figura 2.7. Muerte compatible con piroptosis de células B de LLC en cultivo. A- Se estudió la presencia de caspasa-1 activa y viabilidad celular de células B IgM+ de pacientes con LLC puestas en cultivo, sin señales de sobrevida, mediante citometría de flujo. Para evaluar la activación de caspasa-1 se utilizó la sonda FLICA 660-YVAD-FMK y como indicador de permeabilidad de membrana el agente intercalante DAPI. Se muestran gráficos de puntos representativos de las células IgM+ a 24, 48 y 72 hs de cultivo y al momento del descongelado (0 hs). Las células doble positivas DAPI+660-YVAD-FMK+ serían fenotípicamente compatibles con células que están muriendo por piroptosis. B- Se determinó el porcentaje de células IgM+ positivas para caspasa-1 activa y DAPI a cada uno de los tiempos de cultivo. Se utilizaron PBMCs provenientes de 11 pacientes con LLC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ t test. C- Se determinó que porcentaje de células B positivas para DAPI eran a su vez positivas para caspasa-1, mostrando la contribución de la muerte celular por piroptosis a la muerte total en cada uno de los tiempos de cultivo

nos preguntamos si la piroptosis no podía estar jugando, también, un rol en este fenómeno.

En este sentido, evaluamos el estado de PBMCs de pacientes con LLC a diferentes tiempos de cultivo por citometría de flujo. Utilizamos la sonda FLICA 660-YVAD-FMK, para marcar caspasa-1 activa, y DAPI, como marcador de viabilidad celular. El doble marcado 660-YVAD-FMK+DAPI+ sería indicador de células que están experimentando una muerte celular compatible con la piroptosis, con activación de caspasa-1 y permeabilidad de la membrana celular. Como se puede observar en

los gráficos de puntos, se logra identificar una población de células B (IgM+) con este doble marcado y la misma aumenta significativamente con el tiempo de cultivo. Esto sería un primer indicio claro de que, al menos en estas condiciones, las células de LLC morirían de una forma que es compatible, fenotípicamente, con la reportada para la muerte piroptótica (**Figura 2.7-A y 2.7-B**).

Como se puede observa en la **Figura 2.7-C** las células que mueren por piroptosis representarían aproximadamente un tercio del total de células con la membrana permeabilizada a las 48 hs, lo cual podría significar una contribución importante de la misma en este contexto experimental. Por otra parte, que no todas las células DAPI positivas sean también positivas para caspasa-1 nos ayuda a descartar que el doble marcado se deba a un artefacto generado por el hecho de que son células moribundas. Otro marcador de muerte celular por piroptosis es la liberación al medio de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Resultados del grupo de trabajo indicarían que la presencia de LDH en el medio de cultivo de PBMC leucémicas incrementa con el tiempo de cultivo (**Figura S4.3.**).

Para evaluar si este proceso de muerte es dependiente de la acción de caspasa-1 colocamos en cultivo las células de LLC en presencia, o no, de un inhibidor peptídico de la misma (Ac-YVAD-CMK). Tanto a 24 hs como 48 hs se puede observar que el agregado del inhibidor de caspasa-1 disminuye la muerte espontánea de las células de LLC, comparado con la situación control (**Figura 2.8.**). Demostrando, entonces, que existe una relación directa entre la actividad de caspasa-1 y la muerte de las células de LLC, y dando pistas firmes de que la activación del inflammasoma, mostrada antes en estas células tumorales, podría conducir a la muerte de las mismas de un forma caspasa-1 dependiente. En este punto, el siguiente paso consistió en demostrar si existe un vínculo entre la expresión de TMEM176A y la activación de caspasa-1.

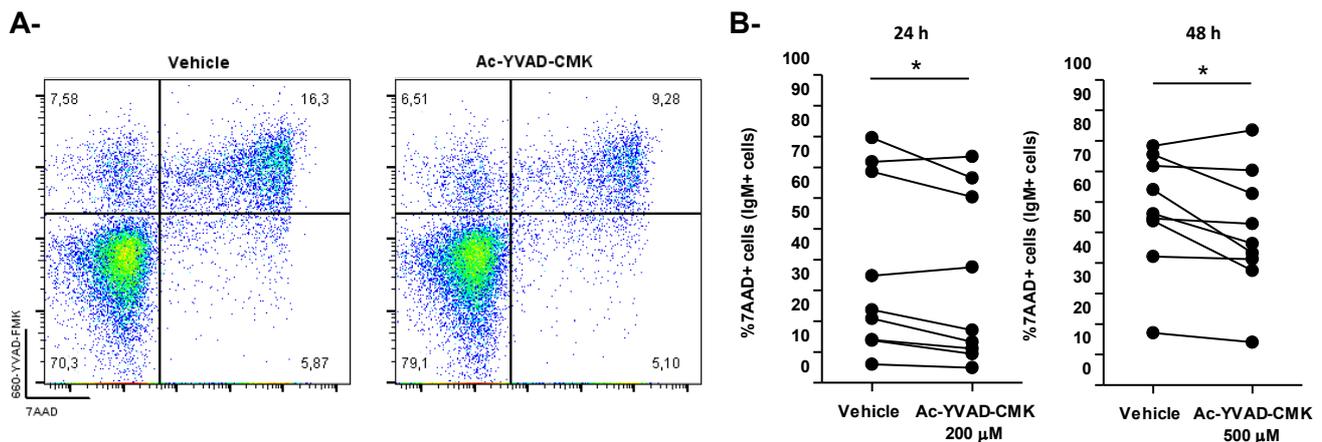


Figura 2.8. Muerte de células B de LLC con inhibidor de caspasa-1. **A-** Se estudió la activación de caspasa-1 y viabilidad de células B IgM+ de pacientes con LLC puestas en cultivo, sin señales de sobrevida, en presencia o no del inhibidor peptídico de caspasa-1 Ac-YVAD-CMK. Para evaluar la activación de caspasa-1 se utilizó la sonda FLICA 660-YVAD-FMK y como indicador de permeabilidad de membrana el agente intercalante 7AAD. Se muestran gráficos de puntos representativos de las células IgM+ incubadas por 48 hs con 500 μM del inhibidor de caspasa-1 Ac-YVAD-CMK o el equivalente de vehículo. Las células doble positivas DAPI+660-YVAD-FMK+ serían fenotípicamente compatibles con células que están muriendo por piroptosis. **B-** Se determinó el porcentaje de células IgM+ positivas para 7AAD luego de 24 o 48 hs de cultivo con la concentración indicada de inhibidor de caspasa-1 Ac-YVAD-CMK o el equivalente de vehículo. Se utilizaron PBMCs provenientes de 9 pacientes con LLC. * $p < 0.05$ t test.

2.4.5. Silenciamiento de TMEM176A en PBMCs de LLC

Para determinar si efectivamente TMEM176A estaba actuando como regulador del inflammasoma en este contexto se evaluó la activación de caspasa-1, luego de 48 hs de cultivo, en células de LLC a las que se les silenció la expresión de dicha proteína.

En primer lugar, se pusieron a punto las condiciones para realizar el silenciamiento de proteínas, mediante el uso de siRNA, en PBMCs de pacientes con LLC. Para la puesta a punto se utilizó un siRNA conjugado a FAM específico para la proteína de expresión constitutiva GAPDH, la presencia del fluorocromo permitió evaluar la eficiencia de transfección, en las distintas condiciones ensayadas, por citometría de flujo. Como se observa en la **Figura 2.9.** para las condiciones seleccionadas se puede distinguir claramente una población positiva para la presencia del siRNA

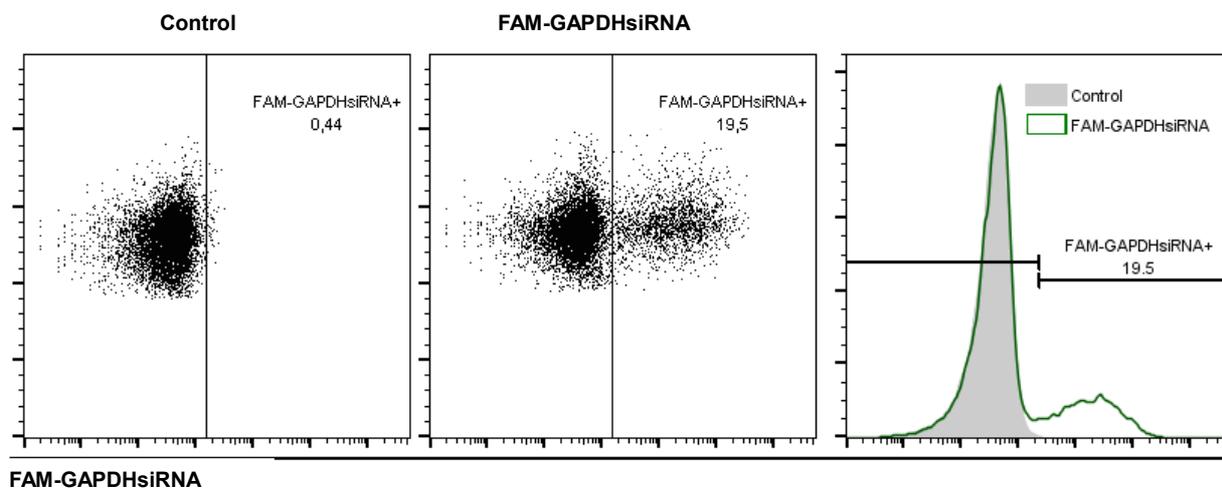


Figura 2.9. Puesta a punto del silenciamiento proteico mediante siRNA en células de LLC. PBMCs de pacientes con LLC fueron transfectadas con 50 nM de un siRNA para GAPDH conjugado al fluoróforo FAM, o un siRNA control sin conjugar, y la transfección fue evaluada a las 48 h mediante citometría de flujo. Como se puede observar en los gráficos de puntos aproximadamente un 20% de las células presentan el siRNA fluorescente a las 48 hs posttransfección y esta población se puede distinguir claramente de aquella sin transfectar. En el caso del siRNA control sin conjugar todas las células fueron negativas para FAM, de acuerdo a lo esperado.

(FAM-GAPDH-siRNA+). Se intentó corroborar el silenciamiento de GAPDH mediante WB no encontrándose una disminución significativa en la condición con siRNA específico comparado con el siRNA control, creemos que debido al bajo porcentaje de células efectivamente transfectadas.

En los ensayos de silenciamiento de TMEM176A se utilizaron dos siRNA diferentes para esta proteína, a los que llamaremos TMEM176A siRNA(1) y TMEM176A siRNA(2), y un siRNA irrelevante, utilizado como control. Como las eficiencias de transfección alcanzadas fueron relativamente bajas se optó por realizar la co-transfección del siRNA de interés y un siRNA irrelevante conjugado a FAM. De esta forma los análisis posteriores se realizaron sobre la población de células efectivamente transfectadas (FAM-siRNA+) y no sobre la población total. El promedio de células con siRNA a 48 hs, tomando en cuenta los diferentes ensayos, fue de aproximadamente un 8% yendo entre un 3.4% y un 19.7% de células positivas para la presencia del siRNA, sin diferencia en la eficiencia de transfección cuando se utilizó el siRNA control o los siRNA 1 y 2 para

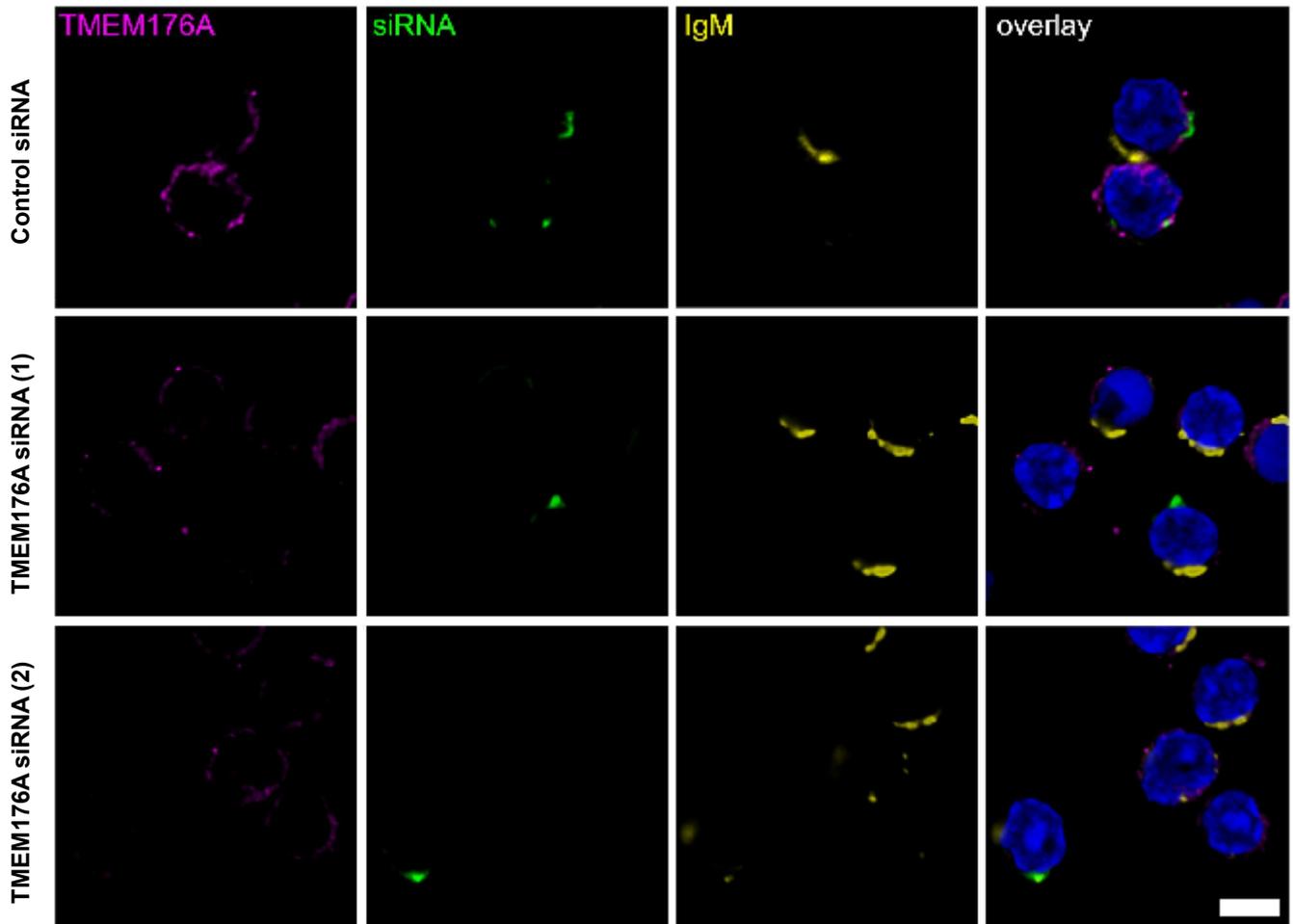
TMEM176A.

El silenciamiento de TMEM176A se evaluó a nivel de proteína mediante inmunofluorescencia. Como se muestra en la **Figura 2.10.A** las células transfectadas con los siRNA para TMEM176A mostraron una expresión menor de la proteína, comparado con las que fueron transfectadas con el siRNA control e incluso con células dentro del mismo campo sin siRNA (no verdes). A partir de las imágenes de microscopía se cuantificó el silenciamiento midiendo la intensidad de fluorescencia para dicha proteína en un número representativo de células IgM (amarillas) que presentaban el siRNA (verdes), en las condiciones control o con cada uno de los siRNA específicos para TMEM176A. Esto se realizó de manera automática, utilizando un macro en el programa FIJI, este macro seleccionó las células FAM-siRNA+IgM+ y cuantificó la señal de TMEM176A en ellas. Las células B transfectadas con los siRNA para TMEM176A 1 y 2 mostraron una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia para la proteína comparado con las células transfectadas con el siRNA control (**Figura 2.10-B**). De esta manera se corroboró efectivamente el silenciamiento de TMEM176A en las células de LLC transfectadas con los siRNA específicos, procediéndose a estudiar el efecto de este silenciamiento en la activación del inflamasoma.

2.4.6. Efecto del silenciamiento de TMEM176A sobre la activación de caspasa-1 en células B de LLC

Como se mostró anteriormente, cuando las células de LLC son colocadas en cultivo sin ningún estímulo de sobrevida o proliferación activan caspasa-1 de manera espontánea. En esta parte nos propusimos evaluar que sucedía con la activación de caspasa-1 en estas condiciones, luego de 48 hs de cultivo, en células de LLC a las cuales se les silenció la expresión de TMEM176A. Si TMEM176A está actuando como un regulador negativo de este fenómeno esperaríamos un

A-



B-

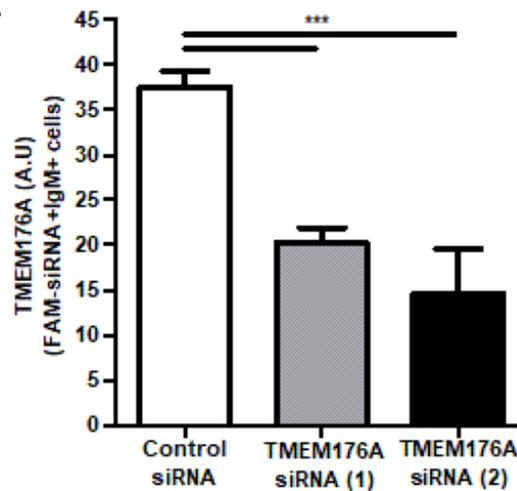


Figura 2.10. Silenciamiento de TMEM176A en PBMCs de LLC. A- PBMCs de pacientes con LLC fueron transfectadas con 50 nM de dos siRNA (1 o 2) específicos para TMEM176A o un siRNA control y el silenciamiento de TMEM176A fue evaluado a las 48 h post-transfección mediante inmunofluorescencia. Magenta:TMEM176A, verde: FAM-siRNA, amarillo: IgM, azul: DAPI. 60XOil. Microscopio confocal Leica DMI6000, TCS-SP5. Se observó que las células IgM transfectadas con los siRNA 1 o 2 para TMEM176A tienen una expresión menor de dicha proteína que las IgM con siRNA control, e incluso que las IgM sin siRNA dentro del mismo campo. B- La expresión de TMEM176A se cuantificó a partir de las imágenes de inmunofluorescencia en al menos 50 células IgM con siRNA control o específico para TMEM176A utilizando el programa FIJI. A.U.: unidades arbitrarias de fluorescencia. La expresión de TMEM176A fue significativamente menor en las células IgM transfectadas con los siRNA 1 o 2 para TMEM176A comparado con las transfectadas con el siRNA control. $P < 0,001$, t- test.

incremento en la activación de caspasa-1 cuando se disminuye su expresión. Para esto se evaluó la activación de caspasa-1 mediante citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente FLICA 660-YVAD-FMK. Se determinó el porcentaje de células con caspasa-1 activa dentro de las células B que presentaban siRNA específicos para TMEM176A comparado con las células B que presentaban siRNA control.

Como se muestra en la **Figura 2.11**, hay un porcentaje significativamente mayor de células B con caspasa-1 activa luego de 48 hs de cultivo dentro de las células con expresión disminuida de TMEM176A comparado con el control, esto se observó cuando se utilizaron ambos siRNA específicos para el silenciamiento. De esta parte podemos concluir que TMEM176A estaría regulando la activación de caspasa-1 en las células leucémicas ya que su silenciamiento repercute

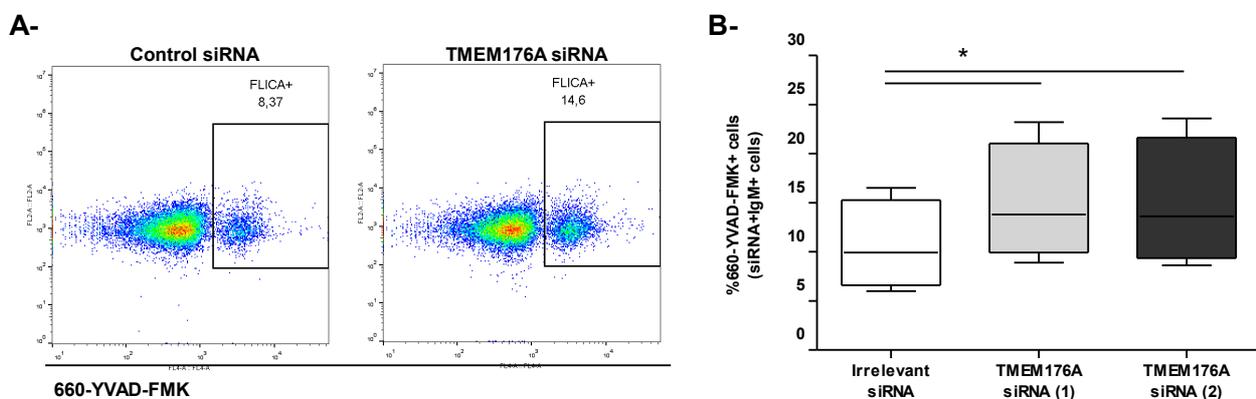


Figura 2.11. Efecto del silenciamiento de TMEM176A en la activación de caspasa-1 en PBMCs de LLC. **A-** PBMCs de pacientes con LLC fueron transfectadas con 50 nM de dos siRNA (1 o 2) específicos para TMEM176A o un siRNA control, en conjunto con un siRNA conjugado a FAM. A las 48 hs post transfección se utilizó la sonda FLICA 660-YVAD-FMK para determinar el porcentaje de células con caspasa-1 activa dentro de la población de células B efectivamente transfectadas (IgM+FAM+). Se muestran gráficos de puntos representativos de lo encontrado cuando las células fueron transfectadas con un siRNA específico para TMEM176A, comparado con las transfectadas con un siRNA control. **B-** Se determinó el porcentaje de células B siRNA+ con caspasa-1 activa a las 48 hs de ser transfectadas con dos siRNA diferentes específicos para TMEM176A o un siRNA control. En las condiciones en las que se silenció TMEM176A se encontró un porcentaje significativamente mayor de células con caspasa-1 activa comparado con la condición control. Se utilizaron PBMCs de cuatro pacientes con LLC progresiva. * P<0,05, t- test.

en una mayor activación de esta proteína. Las células de LLC experimentan cambios morfológicos importantes durante su muerte, disminuyendo notoriamente su tamaño, lo que se puede visualizar en un gráfico de puntos de tamaño versus complejidad. Si bien en este ensayo no se incluyó un marcador de viabilidad, que permitiera determinar la muerte celular de forma precisa, los cambios en la morfología celular parecerían indicar que el silenciamiento de TMEM176A no solo repercutió en una mayor activación de caspasa-1 sino también en un incremento en el porcentaje de células en proceso de muerte.

2.4.7. Correlación entre la expresión de TMEM176A y el clivado de GSDMD en PBMCs de LLC

Para poder concluir que TMEM176A estaría regulando no solo la activación de caspasa-1 en células de LLC sino también su muerte celular por piroptosis sería necesario comparar el clivado de la proteína ejecutora GSDMD entre células con y sin silenciamiento de TMEM176A. Esto nos presentaba dificultades grandes desde un punto de vista técnico, ya que sería necesario separar por FACS un número suficiente de células B transfectadas con siRNA para el análisis posterior de GSDMD por WB, sin que la viabilidad de las células y su estado se viera afectado por el procedimiento de separación.

Dada la dificultad para lograr este punto decidimos estudiar la correlación entre la expresión de TMEM176A y el clivado de GSDMD, en particular la presencia de la fracción p30, descrita como la responsable de mediar la muerte celular por piroptosis, en PBMCs de pacientes con LLC. Cuando comparamos el clivado de GSDMD a la forma p30, a través del ratio con la forma pro de la proteína, con la expresión de TMEM176A observamos una relación significativa entre un clivado mayor de GSDMD a la forma mediadora de la piroptosis con una expresión mayor de TMEM176A (**Figura 2.12**). Esto iría en el sentido de que la expresión de TMEM176A podría regular de manera

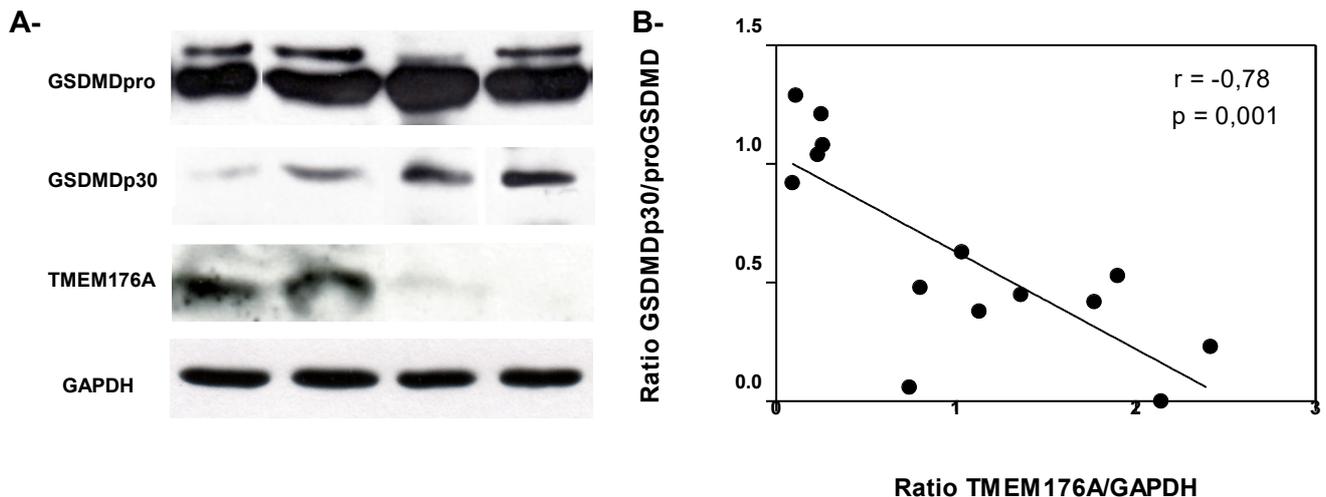


Figura 2.12. Correlación entre la expresión de TMEM176A y el clivado de GSDMD en PBMCs de LLC. A- Se realizó el WB anti-TMEM176A y anti-GSDMD de lisados de células B CD19+ de LLC purificadas a partir de PBMCs de pacientes con LLC por selección positiva mediante MACS. Western blot representativo en el que se puede observar que hay una presencia mayor de la fracción p30 de GSDMD en aquellas muestras con menor expresión de TMEM176A, sin cambios significativos en la proGSDMD en ambas situaciones. La proteína GAPDH fue utilizada como control de carga. B- La presencia de proGSDMD y la fracción p30, así como de TMEM176A y GAPDH, se cuantificó a partir de los WB mediante densitometría utilizando el programa Image J, y se establecieron los ratios GSDMDp30/GSDMDpro y TMEM176A/GAPDH. Se observa una relación significativa entre un menor clivaje de GSDMD a la forma p30 y una mayor expresión de TMEM176A. Se analizaron 14 pacientes diferentes. $p < 0.001$ test de Pearson.

negativa el clivado de GSDMD para generar la forma p30, regulando de esta manera la muerte celular por piroptosis de células B de pacientes con LLC. Para estos experimentos se utilizaron o células B purificadas por MACS, mediante selección positiva con el marcador CD19, o PBMCs de pacientes con un porcentaje de células leucémicas mayor al 95%, por lo que los resultados corresponden a lo que sucede en las células B leucémicas.

2.4.8. Inhibición farmacológica de TMEM176A en células de LLC y muerte por piroptosis

Una de la líneas de trabajo del laboratorio se dirige a la búsqueda de drogas capaces de inhibir o potenciar la función de TMEM176A. En este sentido en un trabajo previo, realizado por Sofía Russo, se encontró que el compuesto $+(-)$ BayK8644 es capaz de inhibir la función de canal iónico de TMEM176A en células CHO transfectadas con dicha proteína (**Figura 2.13-A**).

Dado que previamente demostramos que la disminución de la expresión de TMEM176A mediante siRNA repercutía en un aumento de la activación de caspasa-1 en estas células y que la actividad de caspasa-1 podía conducir a la muerte de las mismas, en este punto nos propusimos evaluar si la inhibición farmacológica de la actividad de TMEM176A utilizando el (+/-)BayK8644 tenía el mismo efecto. Esto nos pareció sumamente importante ya que una droga como esta podría ser aplicable en la clínica.

Para esto colocamos en cultivo PMBCs de pacientes con LLC en presencia de distintas concentraciones de (+/-)BayK8644 o vehículo, como control, y evaluamos la muerte de las mismas por citometría de flujo a 24 y 48 hs. Encontramos un porcentaje mayor de células B leucémicas con

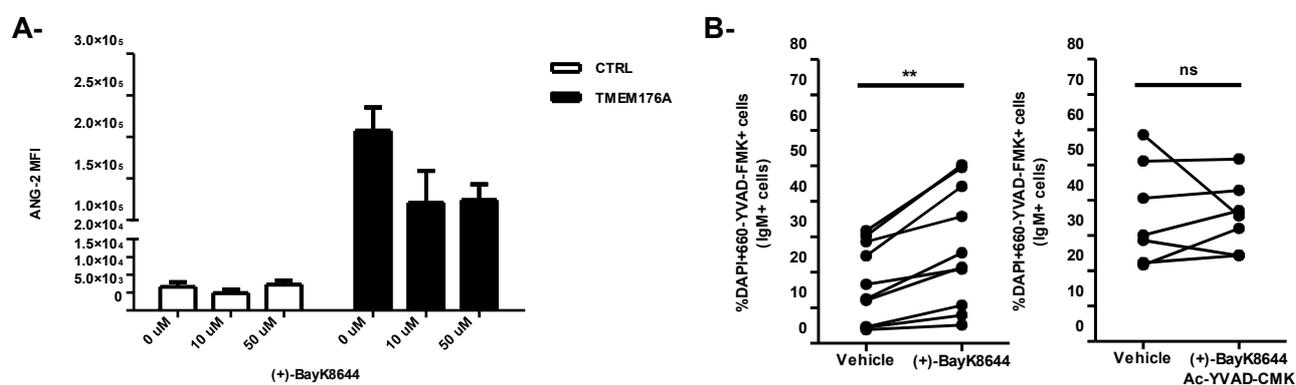


Figura 2.13. Efecto de la inhibición farmacológica de TMEM176A en la muerte por piroptosis de células de LLC.

A- Utilizando la sonda fluorescente ANG-2 se evaluó el efecto en los niveles intracelulares de sodio de diferentes dosis de (+)-BayK8644 sobre células CHO que sobreespresaban TMEM176A comparado con células control. Se determinó que el (+)-BayK8644 disminuye los niveles de sodio intracelular específicamente en células transfectadas con TMEM176A, actuando como inhibidor de las función de canal iónico de esta proteína. **B-** 1×10^6 PBMCs de pacientes con LLC fueron cultivadas en placas de 96 pocillos con (+)-BayK8644 a 50 μM o el equivalente de EtOH (Vehículo) por 24 hs. En otra condición se colocaron las células en presencia de (+)-BayK8644 50 μM y el inhibidor de caspasa-1 Ac-YVAD-CMK a 200 μM o el equivalente de vehículo de ambos. Se recuperaron las células y se determinó la activación de caspasa-1 y la viabilidad celular por citometría de flujo. Para evaluar la activación de caspasa-1 se utilizó la sonda FLICA 660-YVAD-FMK y como indicador de permeabilidad de membrana el agente intercalante DAPI. Se encontró un aumento significativo en el porcentaje de células DAPI+Caspasa-1+ cuando las células son incubadas en presencia de (+)-BayK8644 comparado con el control, sin embargo, no se observaron diferencias cuando las células se incuban con (+)-BayK8644 en presencia del inhibidor de caspasa-1. ** $p < 0.01$, t-test.

un fenotipo piroptótico (660-YVAD-FMK+DAPI+) cuando las mismas fueron incubadas por 24 hs en presencia de +(-)BayK8644 a 50 μ M comparado con la condición control (**Figura 2.13-B**). Sin embargo, cuando a la presencia de +(-)BayK8644 se le agrega el inhibidor de caspasa-1 Ac-YVAD-CMK se pierde el efecto de la droga, indicando que el mismo depende de la acción de la caspasa-1 activa (**Figura 2.13-B**).

En este punto demostramos que la inhibición farmacológica de TMEM176A utilizando la droga +(-)BayK8644 es capaz de inducir la muerte de células B leucémicas de una manera dependiente de la activación de caspasa-1. Esto por un lado sostiene y complementa los resultados obtenidos con el siRNA de TMEM176A mostrando a dicha proteína como un regulador de la activación del inflammasoma y la muerte piroptótica en las células de LLC, y, por otro lado, postula a la droga +(-)BayK8644 como un posible agente terapéutico en la LLC, dada su capacidad de inducir la muerte de las células tumorales.

2.4.9. Efecto combinado de +(-)BayK8644 y Venetoclax en la muerte de células de LLC

Actualmente existen varias opciones terapéuticas para el tratamiento de la LLC, un fármaco introducido recientemente a la clínica es el Venetoclax. El mecanismo de acción propuesto para el Venetoclax indicaría que el mismo provocaría la muerte apoptótica de las células de LLC. Ya que previamente mostramos que el +(-)BayK8644 induciría la muerte piroptótica de las células de LLC nos propusimos evaluar si existiría un efecto aditivo y/o sinérgico entre estas dos drogas, que en principio no compartirían un mismo mecanismo de acción.

Para esto colocamos PBMCs de pacientes con LLC en presencia de +(-)BayK8644 a 50 μ M o el equivalente de vehículo por 24 hs y transcurrido este tiempo agregamos Venetoclax a 10 nm o el

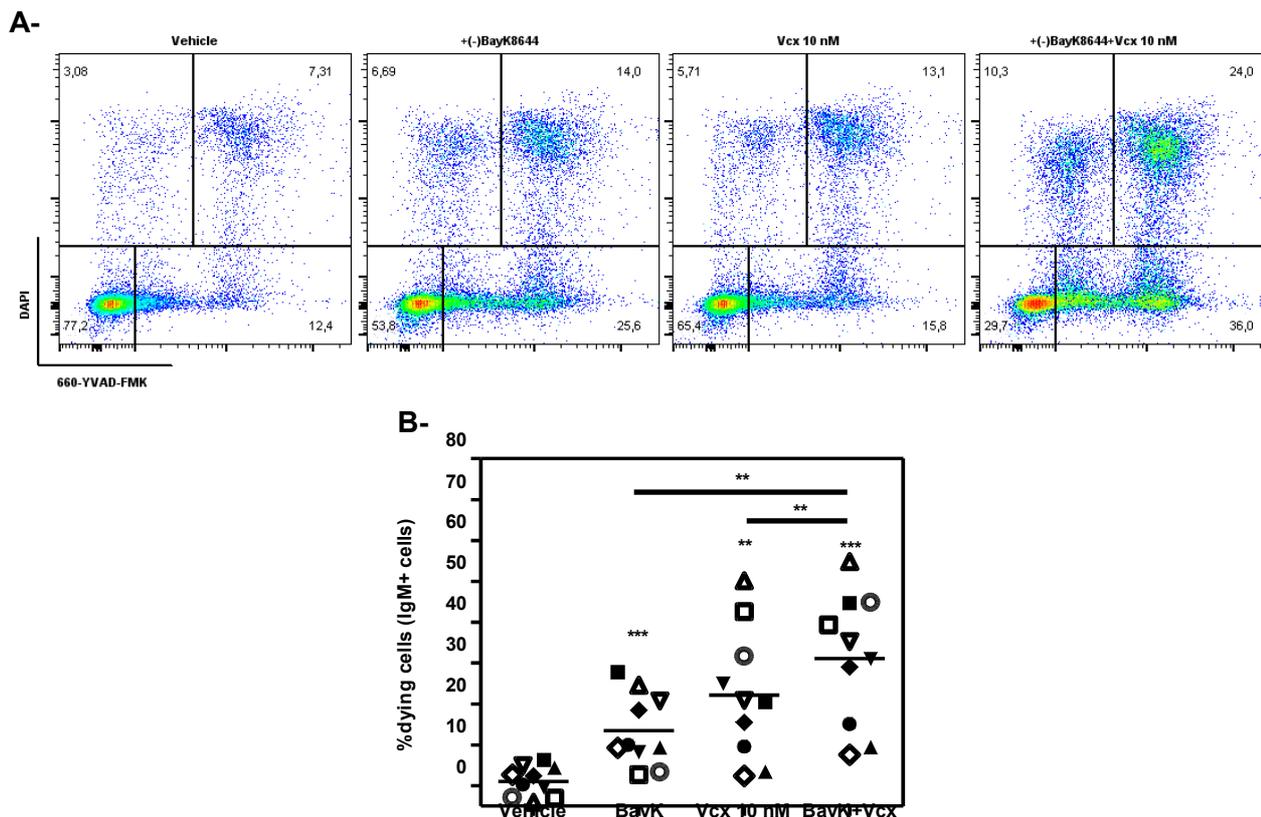


Figura 2.14. Efecto combinado de +(-)BayK8644 y Venetoclax en la muerte de células de LLC. A- 1×10^6 PBMCs de pacientes con LLC fueron cultivadas en placas de 96 pocillos con (+)-BayK8644 a $50 \mu\text{M}$ o el equivalente de EtOH (Vehículo) por 20 hs. Transcurrido este tiempo se agregó Venetoclax a 10 nM o el equivalente de DMSO de este por 4 horas. Se recuperaron las células y se determinó la activación de caspasa-1 y la viabilidad celular por citometría de flujo. Para evaluar la activación de caspasa-1 se utilizó la sonda FLICA 660-YVAD-FMK y como indicador de permeabilidad de membrana el agente intercalante DAPI. Se muestran gráficos de puntos representativos de las células IgM+ luego del tratamiento con cada una de las drogas de forma individual o el tratamiento combinado, así como de las células en presencia de vehículo. B- Se determinó el porcentaje de células B moribundas como la sumatoria de células DAPI+, Caspasa-1+ y DAPI+Caspasa-1+. Cada uno de los símbolos representa un paciente. Se puede observar un aumento significativo del porcentaje de células moribundas cuando las mismas fueron tratadas con BayK, Vcx o BayK+Vcx comparado con la situación control, así como un aumento significativo en este porcentaje en el caso del tratamiento combinado comparado con las situaciones con droga única. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, t-test.

equivalente de vehículo. Luego de 4 hs evaluamos la muerte celular por citometría de flujo como se describió anteriormente. Encontramos un aumento significativo en el porcentaje de células moribundas cuando las mismas fueron tratadas con +(-)BayK8644, coherente con nuestros resultados anteriores, y con el tratamiento con Venetoclax, compatible con lo reportado en la bibliografía (**Figura 2.14.**). De manera interesante encontramos un aumento significativo en el porcentaje de células B leucémicas moribundas cuando las mismas son tratadas con ambas drogas

comparado con cada uno de los tratamientos individuales (**Figura 2.14.**). Esto indicaría que el tratamiento combinado es más efectivo para inducir la muerte de las células de LLC en cultivo que la utilización de cada droga de manera individual, e indicando que el (+-)BayK8644 podría ser complementario a drogas utilizadas actualmente para el tratamiento de la LLC.

Otro resultado interesante es que si bien el Venetoclax ha sido previamente descrito como un agente terapéutico que conduciría a la muerte de las células leucémicas por apoptosis, encontramos que frente al tratamiento con esta droga aparece una población de células de LLC DAPI+660-YVAD-FMK+ que serían fenotípicamente compatibles con células que mueren por piroptosis. Resta, sin embargo, realizar ensayos con el inhibidor de caspasa-1 y evaluar otros parámetros de la muerte piroptótica para poder comprobar este nuevo mecanismo de acción del Venetoclax.

2.5. DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento TMEM176A y B han aparecido relacionadas al cáncer, encontrándose niveles anormales de sus transcritos en diversos escenarios, como ser: carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, y carcinoma de pulmón de célula pequeña (Wang et al. 2002; Hodo et al. 2010; Gottschling et al. 2012). Estos trabajos fueron realizados evaluando la expresión a nivel de ARN mensajero, lo cual no siempre correlaciona con lo que sucede a nivel de proteína. En este sentido, en el trabajo de Cuajungco et al. (2012) muestran que niveles elevados de las proteínas TMEM176A y/o B estarían asociados a algunos tipos de cáncer. Sus resultados mostraron niveles significativamente más altos de TMEM176A y B en linfoma, y de TMEM176A en carcinoma de pulmón, comparado con tejidos normales. Si bien este trabajo representa una primera evidencia de alteraciones en la expresión a nivel de proteína de TMEM176A y/ B en cáncer, se partió de tejidos de biopsia que incluyen tanto células tumorales como células infiltrantes del sistema inmune, por lo que no se puede afirmar que fueran las primeras las que expresaban niveles mayores de TMEM176.

En esta tesis nos propusimos estudiar la expresión y la función biológica de las proteínas TMEM176A y B en el contexto de un cáncer hematológico como es la LLC. Con respecto al primer punto, encontramos una expresión mayor de TMEM176A en muestras de PBMCs de pacientes diagnosticados con LLC progresiva comparado con aquellos con enfermedad indolente, sin encontrar diferencias significativas en la expresión de TMEM176B entre ambos grupos. Mediante western blot e inmunofluorescencia logramos determinar que las células B leucémicas de pacientes con enfermedad progresiva expresan TMEM176A. Si bien no podemos afirmar que las diferencias entre ambos grupos se deban a una diferencia en la expresión de TMEM176A en las células B en particular, creemos que es altamente probable que sea así. Sobre todo debido a que en los pacientes con LLC el porcentaje de

células B tumorales en sangre periférica es muy alto, comparado a las otras poblaciones celulares que podrían estar expresando a TMEM176A.

Si bien en este trabajo no comparamos la expresión de las proteínas TMEM176 en PBMCs de LLC contra células de donantes sanos, un reporte previo de Zuccolo et al. (2013) evaluó la expresión a nivel de ARN mensajero para TMEM176A y B en células B normales (de sangre periférica y amígdalas) y en células B de pacientes con LLC. Ellos encontraron una expresión nula o muy baja de TMEM176A en todos los casos, sin diferencias significativas entre las células B normales y leucémicas (Zuccolo et al. 2013). Para la evaluación en células B de LLC, partieron de muestras de pacientes con enfermedad en estadios RAI 0 o 1 (a excepción de una con estadio RAI 2), lo que en principio correspondería a los pacientes que nosotros definimos como indolentes para la enfermedad. En este sentido, los niveles bajos de ARN mensajero para TMEM176A encontrados por ellos en las muestras de LLC indolente serían coherentes con nuestros resultados a nivel de proteína. Esto, tomado en conjunto con sus resultados en B normales, nos harían esperar que la expresión a nivel de proteína de TMEM176A en células B normales sea o muy similar o menor a la encontrada para el grupo indolente.

Las imágenes de inmunofluorescencia revelaron un marcado para TMEM176A en células B de LLC de tipo puntiforme, coherente con el encontrado en trabajos previos, donde se ha reportado su localización en membrana plasmática, fagolisosomas y vesículas asociadas a la red trans-golgi (Louvet et al. 2005; Cuajungco et al. 2012; Segovia et al. 2014; Drujont et al. 2016). Las características propias de estas células, su tamaño pequeño y escaso citoplasma, hacen difícil establecer la localización subcelular de esta proteína. Incluso es complicado establecer si la misma se encuentra a nivel de la membrana citoplasmática y/o en estructuras intracelulares.

Luego de determinar la expresión de TMEM176A en las células B de pacientes con LLC, y su asociación a la LLC progresiva, nos centramos en estudiar las consecuencias biológicas de esto. Resultados de nuestro grupo de trabajo muestran a TMEM176A y B como reguladores negativos del inflamasoma NLRP3. La sobreexpresión de estas proteínas en células THP-1 disminuyó tanto la activación de caspasa-1 como la liberación de IL-1 β frente a estímulos clásicos del inflamasoma NLRP3 (resultados no publicados). En este sentido, encontramos en muestras de sangre periférica una población de células B IgM+ con activación de caspasa-1 cuyo porcentaje es significativamente menor en las muestras provenientes de pacientes con LLC comparado con donantes sanos. A su vez, esta población está significativamente reducida en las muestras de PBMCs de pacientes con LLC progresiva, que sobreexpresan TMEM176A, comparado con el grupo indolente. Esto sugiere que TMEM176A podría estar actuando como regulador del inflamasoma también en estas células.

En este punto sería interesante conocer cual podría ser el estímulo y la proteína sensora responsable del ensamblado del inflamasoma y el clivado de caspasa-1 en estas células, ya que la activación de inflamasomas en células B y sus consecuencias están muy poco caracterizadas. Algunos ensayos preliminares de inmunofluorescencia parecen mostrar una co-localización de la proteína NLRP3 y caspasa-1 activa en las células de LLC, sugiriendo que esta podría ser la proteína sensora responsable del ensamblado del inflamasoma en este contexto, si bien nos resta aumentar el número de ensayos para poder confirmarlo. En este sentido, un trabajo reciente mostró la función dual del inflamasoma NLRP3 en linfocitos B periféricos humanos activados, actuando como modulador de la secreción de IL-1 β y de la producción de anticuerpos (Ali et al. 2017). Y, en el contexto de la LLC, un trabajo del 2016 evidenció una disminución en la expresión de NLRP3 en linfocitos circulantes de pacientes leucémicos

comparado con donantes sanos (Salaro et al. 2016). En este trabajo se mostró además que el silenciamiento de NLRP3 conducía a una mayor expresión del receptor P2X7 en células THP-1 y un aumento de la proliferación celular, mientras que su sobreexpresión llevaba a la muerte de células por apoptosis (Salaro et al. 2016). Todo esto sugiere que el inflamasoma NLRP3 es un buen candidato a ser el implicado en este proceso, con un rol potencial no sólo en la producción de citoquinas sino también controlando otros procesos celulares, como el balance entre proliferación y muerte celular.

Si bien el inflamasoma NLRP3 parece ser el mejor candidato a participar en este proceso tampoco se puede descartar la participación de otros inflamasomas. De la literatura se desprende que el inflamasoma AIM2 ha sido relacionado de manera frecuente a la biología tumoral y a su vez se ha mostrado su expresión en células B humanas de sangre periférica (Svensson et al. 2017). Aunque no se ha evidenciado su asociación a la LLC, un trabajo muestra como FOXP1, un oncogen activado con frecuencia en células B de leucemias y linfomas que dependen de la activación constitutiva de NF- κ B, reprime la expresión de AIM2 en estas células (van Keimpema et al. 2014). En lo que refiere a la biología del linfocito B, se ha demostrado la activación de caspasa-1 y el clivado de IL-1 β en células B en respuesta al reconocimiento por la proteína IFI16 del virus de Epstein-Barr y del herpes virus asociado al sarcoma de Kaposi, lo que pone de manifiesto que varias proteínas sensoras pueden ensamblar inflamasomas en estas células (Ansari et al. 2013; Singh et al. 2013).

Las principales consecuencias celulares descritas de la activación de caspasa 1 son: el clivado y liberación de la forma activa de las citoquinas pro inflamatorias IL-1 β e IL-18, y la muerte celular por piroptosis. En este sentido, si bien citoquinas pro inflamatorias, como la IL-6, se han asociado a un peor pronóstico en LLC, la IL-1 β parece ser una excepción. El vínculo entre IL-1 β y progresión en LLC se

ha descrito previamente, habiendo algunos artículos de finales de los años 80 y principios de los 90 en los que proponen una relación inversa entre la producción de IL-1 β en cultivo por células B de LLC y el grado de progresión de la enfermedad (Uggla et al. 1987; Pistoia et al. 1986; Aguilar-Santelises et al. 1989; Aguilar-Santelises et al. 1991). Así como una asociación entre los niveles plasmáticos de IL-1 β y progresión, estando disminuida en pacientes progresores (Hulkkonen et al. 2000). En esta misma línea, otro estudio, muestra una asociación entre niveles bajos de esta citoquina en suero y menor supervivencia (Yan et al. 2011). Estos reportes previos son compatibles con nuestros resultados, donde encontramos una menor activación de caspasa-1 en muestras de pacientes con enfermedad progresiva.

Algunos reportes muestran que la IL-1 β podría tener una acción citotóxica sobre ciertas poblaciones celulares como las neuronas (Chiang et al. 2017). Es por esto que nos preguntamos si la IL-1 β no podría mediar la muerte directa de las células de LLC, y esto explicar una presencia menor de caspasa-1 activa en la progresión. Para esto incubamos células de LLC con distintas dosis de IL-1 β humana recombinante y medimos la apoptosis mediante citometría de flujo utilizando anexina V y 7AAD (como agente intercalante) a diferentes tiempos de incubación (**Figura S4.4.**). Los resultados obtenidos no fueron para nada concluyentes, por lo que no pudimos ni descartar ni afirmar un rol directo de esta citoquina pro inflamatoria sobre las células de LLC, y decimos continuar por otro camino.

En este sentido, la activación de caspasa-1 puede conducir también a la muerte de la célula por piroptosis. Como se mencionó en la introducción la piroptosis se define como una muerte celular necrótica, programada, mediada por gasdermina D (GSDMD), luego de su clivado por caspasa-1 o caspasa-11/4/5 (Feng et al. 2018). El clivado de GSDMD para liberar su dominio N-terminal de 30 kDa

del dominio C-terminal inhibidor es un paso determinante en este proceso de muerte. Para confirmar la piroptosis es importante evidenciar la presencia de este fragmento de 30 kDa, ya que en un trabajo reciente se ha demostrado que, en ciertas condiciones, la caspasa-1 activa es capaz de clivar y activar a las caspasas-3/7, lo que lleva a la muerte de la célula por apoptosis (Taabazuing et al. 2017). Las caspasas-3/7 activas, a su vez, evitan la piroptosis al clivar a la GSDMD en un sitio de corte distinto que genera un fragmento proteico de 45 kDa (Taabazuing et al. 2017). Es por esto que, para determinar si las células de LLC efectivamente podían experimentar este tipo de muerte celular, evaluamos mediante western blot la presencia del dominio N-terminal de GSDMD en lisados proteicos de muestras de células B de LLC purificadas.

Efectivamente encontramos este fragmento de la proteína, con un ratio entre la proteína completa y clivada que difería entre las distintas muestras, lo que como evidenciamos luego se podía explicar por diferencias en la expresión de TMEM176A, por lo que continuamos explorando que sucedía con la piroptosis en estas células. Es importante destacar que también encontramos el fragmento de 45 kD, asociado a la apoptosis, lo que sugiere un fuerte vínculo entre ambos procesos de muerte. La muerte de linfocitos B por piroptosis ya ha sido mostrada en la infección de células B1a peritoneales con *C. burnetti*, pero es la primera vez que se muestra en el contexto de esta enfermedad (Schoenlaub et al. 2016).

Existen numerosos reportes en los cuales se pone en evidencia que las células de LLC en cultivo, sin señales de sobrevida, mueren espontáneamente al cabo de unos días por apoptosis (Caligaris-Cappio et al. 2014). Nos propusimos evaluar si en este contexto la piroptosis no podía estar jugando un papel también. En este punto, encontramos un incremento en el porcentaje de células con caspasa-1 activa

y permeabilización de la membrana, así como un incremento en la liberación de LDH, todas características compatibles con la piroptosis, a las 24, 48 y 72 hs luego de que las células son colocadas en cultivo. Este proceso es dependiente de caspasa-1, ya que al agregar un inhibidor peptídico de esta proteína observamos una disminución significativa en el porcentaje de células muertas o en proceso de muerte, aunque sin un bloqueo completo de este proceso. Es cada vez más clara la interconexión y regulación mutua de las distintas formas de muerte celular, por lo que no sería extraño que el bloqueo de caspasa-1 lleve a la activación de mecanismos compensatorios, que expliquen la ausencia de un efecto total del inhibidor. Nos resta determinar el clivado de GSDMD en estas condiciones para terminar de confirmar la muerte celular por piroptosis.

En este sentido, evaluamos que sucedía con la expresión de TMEM176A en las células de LLC con el tiempo de cultivo, ya que esperabamos que al aumentar la activación de caspasa-1 y la piroptosis la expresión de esta disminuyera. Para nuestra sorpresa nos encontramos con el resultado contrario, observándose un incremento en la expresión de TMEM176A en las células de LLC con el tiempo de cultivo (**Figura S4.5.**). Creemos que este fenómeno se puede llegar a explicar en el sentido de que la activación de caspasa-1 lleve a un aumento de TMEM176A como una forma de regulación y autoinhibición, evitando así una respuesta exacerbada, aunque resta realizar ensayos que permitan demostrar esta hipótesis.

Para mostrar de manera directa la acción reguladora de TMEM176A sobre la activación de caspasa-1 y la piroptosis, procedimos al silenciamiento de esta proteína en células de LLC. Cabe destacar que la transfección de PBMCs con siRNAs para silenciar la expresión de proteínas presenta dificultades técnicas importantes, por lo que fue necesaria una exhaustiva puesta a

punto, a pesar de lo cual no alcanzamos tasas de transfección altas. Es por esto que para el análisis de resultados incluimos únicamente las células B efectivamente transfectadas, a las que logramos seleccionar ya que utilizamos siRNA conjugado a una molécula fluorescente. Primero confirmamos el silenciamiento de TMEM176A con los dos siRNA específicos utilizados, a las 48 h post transfección, mediante inmunofluorescencia, y luego procedimos a comparar la activación de caspasa-1 en células B de LLC con TMEM176A silenciada contra células transfectadas con un siRNA control. Elegimos las 48 hs post transfección porque es el tiempo de cultivo en el cual previamente evidenciamos expresión de TMEM176A y un pico en la piroptosis de las células leucémicas. Hayamos un aumento en el porcentaje de células con caspasa-1 activa luego del silenciamiento de TMEM176A comparado con la situación control. Esto nos permitió confirmar el rol de TMEM176A como regulador negativo de la activación de caspasa-1 en el contexto de la LLC, siendo compatible con los resultados encontrados por el grupo de trabajo en células, y modelos animales tumorales y de infección viral.

Este resultado, si bien nos confirma la función inhibitoria de TMEM176A sobre la activación de caspasa-1, no nos permite afirmar su acción reguladora sobre la piroptosis. Para ver la asociación entre ambas determinamos por western blot la presencia de TMEM176A y de la forma completa y el fragmento de 30 kDa de GSDMD en muestras de células B de LLC. Encontramos una asociación significativa entre una mayor expresión de TMEM176A y un menor clivado de GSDMD, dado por un menor ratio GSDMDfl/GSDMDp30. Si bien esto nos indica únicamente una asociación, evaluar de manera directa la acción de TMEM176A sobre el clivado de GSDMD implicaría purificar por FACS células B de LLC con TMEM176A silenciada en una cantidad suficiente como para realizar ensayos de western blot, esto no solo presentaría dificultades por la baja tasa de transfección que

conseguimos, sino que no podríamos saber hasta que punto el proceso de separación no estaría afectando la viabilidad de la células y, por tanto, los resultados finales.

En lo que refiere a la función de TMEM176A en procesos tumorales, dos trabajos recientes mostraron que su expresión estaba disminuida en líneas celulares y muestras tumorales de pacientes con cáncer colorectal, correlacionándose con una mayor metástasis y menor sobrevida global a los 5 años, y en muestras de cáncer de esófago, correlacionando también con una peor sobrevida global a 5 años (Gao et al. 2017; Wang et al. 2017). También encontraron que la expresión de TMEM176A en células tumorales de cáncer colorectal y de esófago inducía la apoptosis e inhibía la migración y capacidad invasiva de las células, correlacionándose su sobreexpresión con una menor proliferación celular (Gao et al. 2017; Wang et al. 2017). Estos resultados, aparentemente contrarios a los encontrados por nosotros en la LLC, hacen sospechar de un rol de TMEM176A en el proceso tumoral altamente dependiente del contexto.

El silenciamiento de TMEM176A mediante siRNA nos permitió determinar su función reguladora, sin embargo, esto no es trasladable a la clínica o incluso a estudios pre clínicos, si pensamos en el bloqueo de TMEM176A como estrategia terapéutica en la LLC. Nuestro grupo de trabajo a caracterizado a la molécula $+(-)$ BayK8644, un agonista de canales de calcio de tipo L, como un inhibidor selectivo de la función de canal iónico de TMEM176A, obteniendo muy buenos resultados en su utilización en modelos tumorales murinos. En este trabajo mostramos la capacidad del $+(-)$ BayK8644 de inducir la muerte de las células de LLC de una manera dependiente de caspasa-1 y fenotípicamente compatible con la piroptosis. El $+(-)$ BayK8644 no ha mostrado tener efectos tóxicos, a dosis compatibles con las usadas por nosotros, en modelos animales, por lo que sería un candidato

interesante para su estudio como droga terapéutica en la LLC. Parece cada vez más claro que los tratamientos combinados, con dos o más drogas actuando de manera sinérgica, son una estrategia a explotar para el abordaje de este tipo de enfermedades. Actualmente existen varias drogas aprobadas para su uso clínico en la LLC, y decidimos explorar el efecto combinado del (+/-)BayK8644 con alguna de ellas.

Como mencionamos en la introducción el Venetoclax es una molécula pequeña que inhibe la acción de proteína BCL2 al actuar como mimético de las proteínas BH3 único. El principal mecanismo molecular de acción propuesto es que la inhibición de BCL2 permite la activación de las proteínas pro-apoptóticas BAK y BAX, estas se traslocan a la membrana externa de la mitocondria donde median la liberación de citocromo C mitocondrial, lo que finalmente lleva a la activación de las caspasas y la muerte de la célula por apoptosis (Roberts et al. 2017). Este mecanismo de acción fue mostrado en un trabajo en el cual células de LLC tratadas con dosis en el orden nanomolar de Venetoclax experimentaron muerte celular a las 4 hs de tratamiento, con un aumento en el porcentaje de células anexina V positivas, clivado de las caspasas 3 y 9, y clivado de PARP, sustrato de caspasa 3. Las células experimentaron además cambios morfológicos notorios como condensación de la cromatina, aumento del tamaño de las mitocondrias y ruptura de su membrana externa (Vogler et al. 2013).

Luego de los resultados obtenidos con el (+/-)BayK8644 nos propusimos ver si existiría un efecto sinérgico al utilizarlo en conjunto con el venetoclax, ya que en principio este último induciría la muerte de las células a través de un mecanismo distinto, al inducir la apoptosis tumoral. En este sentido observamos un aumento significativo del efecto citotóxico sobre células de LLC al utilizar ambas drogas en comparación al tratamiento monodroga, lo que indicaría que podrían llegar a ser

una buena combinación terapéutica. Sin embargo, no podemos decir que se trate de un efecto sinérgico o incluso aditivo, ya que el efecto combinado de ambas drogas sobre la muerte celular no es igual o superior a la suma del efecto que genera cada una de forma individual. Esto puede ser explicado porque exista un solapamiento, al menos parcial, entre los mecanismos de acción de ambas moléculas.

En este sentido, podemos observar que el tratamiento con venetoclax condujo a la activación de caspasa-1 y permeabilización de la membrana en las células de LLC, lo que en principio podría ser compatible con una activación de la muerte celular por piroptosis. Si bien resta confirmar esto, utilizando inhibidores específicos de caspasa-1 y evaluando la liberación de LDH y clivado de gasdermina D, no sería algo a descartar. En primer lugar por el diálogo cercano que existe entre las vías de muerte celular por apoptosis y piroptosis, como se mencionó antes, y además porque el venetoclax induce daño mitocondrial, y el daño mitocondrial ha sido propuesto como uno de los mecanismos canónicos de activación del inflamasoma NLRP3.

Así el pre tratamiento con (+/-)BayK8644, al disminuir la actividad de TMEM176A, podría favorecer que el Venetoclax active la vía de muerte celular piroptótica en las células de LLC. Estudiar más profundamente el mecanismo de acción del Venetoclax parece algo interesante sobre todo dados los excelentes resultados que está teniendo en la clínica, ya sea solo o en combinación con otras drogas, como el Ibrutinib. Este resultado incentiva además a estudiar si otras drogas, también utilizadas para el tratamiento de la LLC, son capaces de inducir la muerte celular piroptótica. En este sentido, realizamos algunos ensayos utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD20 optimizado, GA101, pero sin llegar a obtener resultados concluyentes. Restaría probar el sinergismo del (+/-)BayK8644 con otras

drogas, ya que los mecanismos de acción son muchas veces no del todo comprendidos y se podrían obtener resultados no esperados.

Una de las preguntas más importantes que se desprende de este trabajo es cual es la relevancia biológica que podría tener el tipo de muerte celular sobre el curso de la enfermedad o la respuesta al tratamiento. En principio, al contrario de la apoptosis, que es un reconocido gatillador de respuestas inmunoregulatoras, la muerte celular inmunogénica sería capaz para desencadenar una respuesta inmune efectora. Esto podría tener como consecuencia que tratamientos capaces de inducir muerte celular piroptótica serían potencialmente capaces de activar células presentadoras de antígeno y por tanto llevar a que se genere una respuesta inmune adaptativa contra el tumor, lo que sería sumamente deseado para la erradicación total, o el control de la enfermedad a largo plazo. En algunos modelos de ratón se ha mostrado como el tratamiento con drogas capaces de inducir muerte celular no apoptótica en combinación con adyuvantes fuertes, como ligandos de TLR, genera la eliminación total del tumor y protección frente a la re inoculación de células tumorales, poniendo de manifiesto la generación de memoria inmunológica (Cheadle et al. 2017).

En este escenario parece sumamente interesante el efecto que podría tener el +(-)BayK8644 en un modelo *in vivo* de LLC, ya que por un lado estaría favoreciendo de manera directa la muerte de las células tumorales por piroptosis, un tipo de muerte celular inmunogénica, y por otro disminuiría la actividad de TMEM176A en células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas, donde se sabe TMEM176A y B ayudan a mantener el estado inmaduro de las mismas, favoreciendo su activación. Una de las perspectivas de este trabajo es justamente estudiar el efecto del +(-)BayK8644 en el tratamiento de la LLC en un modelo de ratones transgénico E μ /TCL1, sólo y en combinación con

el venetoclax. En este punto sería importante evaluar no solo el efecto sobre el desarrollo de la enfermedad sino en la respuesta inmune generada contra el clon tumoral.

CAPÍTULO III: Respuesta adaptativa de células T frente a *Leptospira* y rol de Tmem176b en un modelo murino de infección

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. ESTRATEGIAS DE INMUNOEVASIÓN UTILIZADAS POR LAS BACTERIAS

Para poder sobrevivir, todos los organismos han generado estrategias para defenderse de los predadores. Desde los orígenes de la vida, estas estrategias se han ido optimizando, a la vez que los posibles predadores desarrollaron distintos mecanismos de evasión para su propia supervivencia. Esta competencia ha llevado a una sana co-evolución de ambos. El sistema inmunitario es capaz de distinguir microorganismos patógenos de aquellos que no generan daño, y responder a los primeros. En este proceso participan tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa. La respuesta inmune innata determina la naturaleza de la respuesta adaptativa, siendo el sistema inmune capaz de responder en forma diferencial a distintos agentes agresores. Defectos heredados o adquiridos en la respuesta inmune son causa de susceptibilidad a ciertas infecciones.

La supervivencia y virulencia de un patógeno dependen de su capacidad para evadir o resistir la respuesta inmune del hospedero. Algunos microbios son eliminados completamente mientras que otros se establecen y quedan latentes, siendo controlados por la respuesta inmune pero no eliminados por completo. De manera similar a lo que ocurre en el cáncer, los patógenos han desarrollado mecanismos que les permiten regular la respuesta inmune para su propio beneficio, muchas veces, explotando mecanismos fisiológicos de inmunoregulación. Existen múltiples ejemplos de esto, y de hecho cada grupo de microbios presenta sus propias estrategias particulares de evasión. Las bacterias extracelulares son aquellas capaces de dividirse fuera de las

células del hospedero, mientras que las intracelulares requieren de estas para su replicación. Algunas bacterias atraviesan etapas dentro y fuera de las células, donde son susceptibles a diferentes mecanismos de destrucción por parte del sistema inmunitario.

La respuesta inmune a bacterias extracelulares está dirigida a eliminar las bacterias y a neutralizar las toxinas. Los principales mecanismos mediados por el sistema inmunitario innato, capaces de eliminar este tipo de patógenos, implican: la producción de citoquinas pro- inflamatorias, en respuesta al reconocimiento de PAMPs por PRRs; la fagocitosis mediada por neutrófilos y macrófagos; y las funciones mediadas por el sistema complemento. En lo que respecta a la inmunidad adaptativa, las funciones de los anticuerpos de opsonizar bacterias, activar la vía clásica del complemento y neutralizar las toxinas, son las más destacadas de la rama humoral. Se considera que las respuesta de células T CD4+ de tipo Th1 serían las más efectivas para combatir este tipo de microbios. Esto se debe a su capacidad de activar los macrófagos, a través de la liberación de IFN- γ , y reclutar y activar neutrófilos, al inducir la liberación de TNF- α y linfotóxina. Por su capacidad de reclutar neutrófilos, las células T CD4+ de tipo Th17 también son relevantes en algunas infecciones por bacterias extracelulares (Bedoya et al. 2013).

En lo que respecta a las bacterias intracelulares, muchas de ellas son capaces de sobrevivir dentro de los fagocitos (Mitchell et al. 2016). Para su eliminación es clave el reconocimiento a través de PRRs intracelulares como ser TLRs, CLRs y NLRs. Este reconocimiento gatilla la producción de IL-12, citoquina que activa a las células NK, las cuales, a su vez, producen IFN- γ , que estimula a los macrófagos y potencia su capacidad lítica. En cuanto a la inmunidad adaptativa, los linfocitos T CD4+ Th1 aparecen como fundamentales, ya que contribuyen a la activación de los macrófagos y

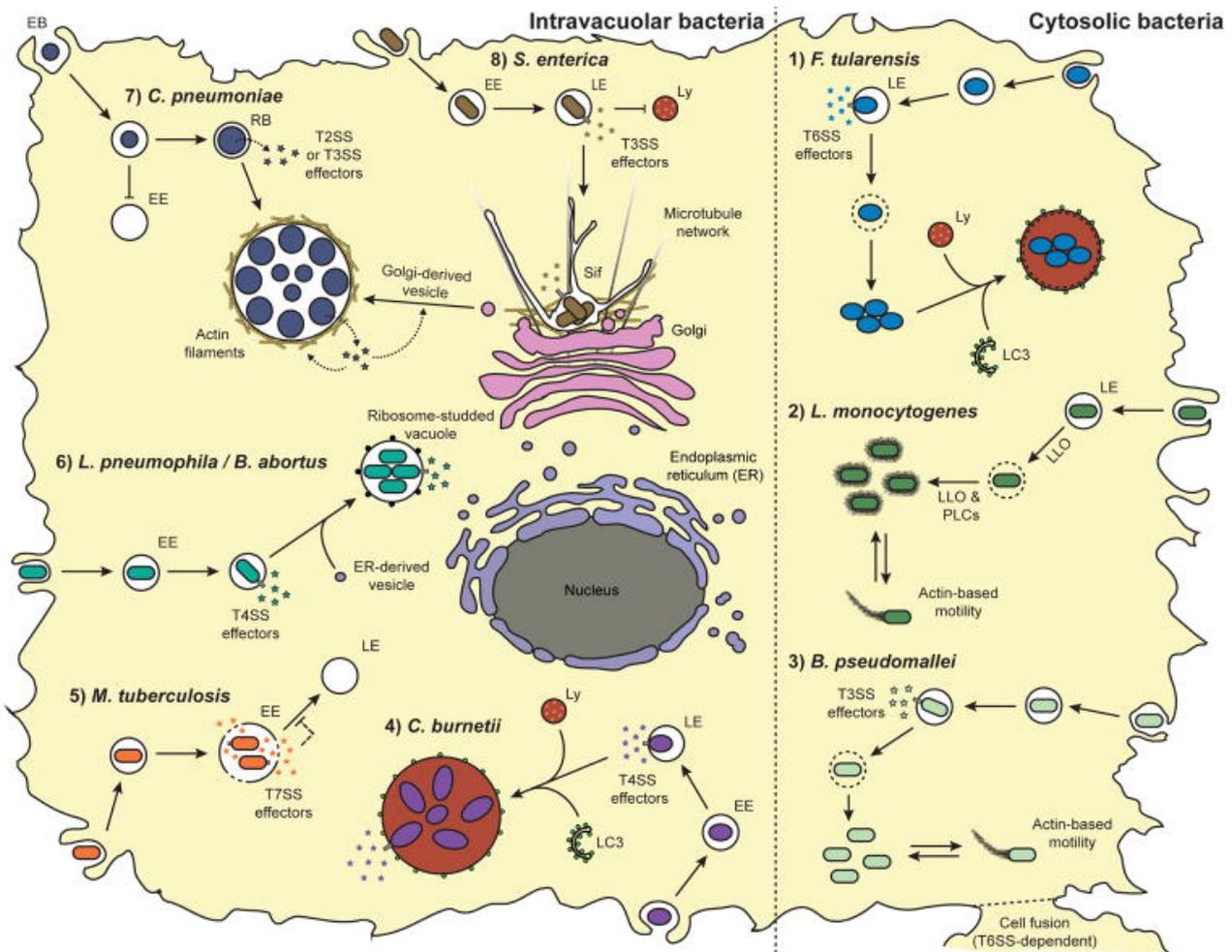


Figura 3.1. Estrategias de evasión de patógenos bacterianos intracelulares. (1) *F. tularensis* escapa de vacuolas tipo endosomas tardíos de una manera dependiente del sistema de secreción de tipo 6 (T6SS). Luego de su replicación en el citosol, *F. tularensis* puede retranslocalizar a compartimientos unidos a membrana similares a autolisosomas. (2) *L. monocytogenes* escapa de la vía fagolisosomal usando los efectores LLO y PLCs del sistema de secreción de tipo 2 (T2SS). *L. monocytogenes* replica rápidamente en el citosol y utiliza la maquinaria de polimerización de actina celular para moverse dentro y entre células. (3) *B. pseudomallei* escapa al citosol de una manera dependientes del sistema de secreción de tipo 3 (T3SS). *B. pseudomallei* tiene una movilidad basada en la actina y promueve la fusión de las células del hospedero. (4) *C. burnetii* está adaptada a la vía fagolisosomal y reside en compartimientos tipo fagolisomas. El sistema Dot/Icm es requerido para el reclutamiento del marcador LC3 y la biogénesis vacuolar. (5) *M. tuberculosis* detiene la maduración del fagosoma en el estado de endosoma temprano. (6) *L. pneumophila* y *B. abortus* emigran de la ruta endocítica en el estadio de endosoma temprano, reclutan vesículas derivadas del retículo endoplasmático y forman vesículas especializadas con ribosomas agregados, en una manera dependiente del sistema de secreción de tipo 4 (T4SS). (7) *C. pneumoniae* escapa de la ruta endocítica y forma una vacuola única de inclusión al reclutar vesículas derivadas del Golgi. Los efectores de *C. pneumoniae* promueven la fragmentación del Golgi y generan filamentos de actina alrededor de la inclusión. *Clamidia* se encuentra en dos formas distintas: un cuerpo elemental no replicativo (EB) y un cuerpo reticular replicativo (RB) intracitoplasmático. Efectores T2SS y T3SS se cree están implicados en el ciclo de vida intracelular de *Clamidia*. (8) *S. enterica* replica en compartimientos tipo endosomas tardíos que excluyen enzimas degradativas lisosomales. Imagen tomada de Mitchell et al. 2016.

de linfocitos T CD8+ citotóxicos. Estos últimos, son capaces de reconocer a las células infectadas y mediar su eliminación.

Para resistir las acciones efectoras de la respuesta inmune innata y adaptativa las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de evasión. Muchos patógenos de tipo extracelular son capaces de inhibir la deposición y/o activación del sistema complemento en su superficie. Por ejemplo, casi todos los patógenos Gram-positivos expresan moléculas que son capaces de unir inhibidores del complemento, como el factor H o la proteína de unión a C4b (C4BP), presentes en el suero del hospedador, a la superficie bacteriana (Okumura & Nizet 2014). Estos factores interactúan con la convertasa de C3 y aceleran su decaimiento, siendo los reguladores principales de la activación del complemento en condiciones fisiológicas. Otras bacterias, como *S. aureus*, no unen estos factores reguladores sino que son capaces de secretar proteínas propias que cumplen la misma función (Rooijackers & van Strijp 2007).

Otros mecanismos de virulencia se centran en evadir la fagocitosis y destrucción por fagocitos, ya sea al impedir el reclutamiento y la activación de estas células, inhibir la opsonización mediada por anticuerpos, evitar ser eliminadas por el estallido respiratorio, y/o resistir la acción de los gránulos de los macrófagos. A modo de ejemplo, especies de bacterias Gram-positivas presentan la enzima superóxido dismutasa bacteriana que acelera la conversión de $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 . Las bacterias pueden entonces convertir el H_2O_2 a moléculas menos reactivas. En este punto, la acción de la catalasa es un mecanismo común de las bacterias Gram-negativas y *S. aureus* para oxidar el H_2O_2 a oxígeno molecular y agua (Okumura & Nizet 2014). Algunas bacterias, también, han desarrollado estrategias para acelerar la muerte de los fagocitos a través de la acción de toxinas citolíticas (Okumura & Nizet 2014). Las bacterias intracelulares son especialistas en evitar su destrucción por fagocitos, esto lo logran mediante distintas estrategias, como podemos ver en la **Figura 3.1**. Algunos

patógenos impiden la maduración de los fagosomas, evitando la acidificación o su fusión con los lisosomas, como *M. tuberculosis*. Otras, como *L. monocytogenes*, presentan proteínas que median la ruptura de la membrana del fagosoma permitiendo su escape al citoplasma de la célula (Mitchell et al. 2016). Al evitar ser degradadas por los mecanismos microbicidas de las células los antígenos bacterianos no pueden ser procesados y presentados, evadiendo de esta forma también la respuesta inmune adaptativa. Otra forma de evitar su presentación es inhibir la internalización de componentes bacterianos a células presentadoras de antígeno.

Algunas bacterias, pueden modular el procesamiento y la presentación antigénica al inhibir la expresión de MHC de clase II o clase I y de moléculas co-estimuladoras, o, por la acción de toxinas que interfieren con el tráfico de moléculas de MHC. Esto repercute en una respuesta disminuida de células T. Los patógenos también pueden actuar sobre las células presentadoras de antígeno estimulando la producción de citoquinas inmunoregulatoras, como la IL-10 y el TGF- β , por parte de macrófagos y células dendríticas. Otra estrategia de inmunoevasión implica inhibir la activación de linfocitos, ya sea mediante la fosforilación del TCR o BCR, provocando un aumento en la apoptosis de estas células, o estimulando la diferenciación de los linfocitos T a células T reguladoras. Algunos patógenos, por otra parte, provocan un desvío de la respuesta inmune a respuestas que no son efectivas para eliminar ese patógeno en particular, ejemplo claro de esto lo representa *M. tuberculosis* (O'Garra et al. 2013).

Comprender los mecanismos de evasión y regulación de la respuesta inmune, explotados por los patógenos, es clave para el desarrollo de estrategias profilácticas y/o terapéuticas efectivas, sobretodo pensando en el desarrollo de inmunidad protectora. En este punto, la interacción

patógeno-hopederio en la interfase de la respuesta inmune innata y adaptativa, representada por las células dendríticas es, también, de suma importancia. En este trabajo nos propusimos estudiar la interacción entre las células dendríticas y un patógeno de suma relevancia para la realidad nacional, como es *Leptospira* spp. Nos centramos en la exploración de nuevos mecanismos inmunoreguladores y su impacto en la respuesta inmune adaptativa contra el mismo. A continuación, haremos una breve introducción a las características más relevantes de la infección por *Leptospira* y la respuesta inmune generada contra ella.

3.1.2. LEPTOSPIROSIS Y RESPUESTA INMUNE

Epidemiología y agente etiológico

La leptospirosis es una de las zoonosis con más amplia distribución a nivel mundial. Distintos relevamientos dan cuenta de su creciente impacto como problema de salud humana y animal (Costa et al. 2015; Torgerson et al. 2015). A nivel mundial, se estima que ocurren 1 millón de casos severos por año, ocasionando más de 60.000 muertes, por lo que esta enfermedad muestra tasas de morbi/mortalidad superiores al dengue severo o la leishmaniasis visceral. En nuestro país la leptospirosis en humanos es una enfermedad de notificación obligatoria, que se presenta fundamentalmente como una enfermedad endémica y esporádica, con un número variable de casos anuales. Es considerada una enfermedad ocupacional, con casos que ocurren predominantemente en zonas rurales y peri-urbanas. Se estima que ocurren 15 casos/100.000 habitantes anualmente, afectando principalmente a hombres jóvenes con actividades rurales (Schelotto et al. 2012). Sin embargo, hay pocos estudios publicados que demuestren un nexo epidemiológico entre el hombre y animales domésticos y/o salvajes en la transmisión de la enfermedad (Repiso et al. 2005; Suanes 2013; Meny et al. 2017; Zarantonelli et al. 2018).

En Uruguay la leptospirosis ha sido identificada como una de la enfermedades reproductivas re-emergentes que afectan tanto al ganado bovino de carne como de leche, con datos de seroprevalencia variables según el área geográfica, con un rango de 25-60% a nivel individual y de 50-70% a nivel de establecimientos (Caffarena 1971; Repiso et al. 2005; Suanes 2013).

La leptospirosis es causada por distintas especies patógenas de *Leptospira*, bacterias que pertenecen al orden Spirochaetales (Espiroquetas). Las leptospiras son espiroquetas aerobias obligadas, extracelulares, muy móviles, que comparten características tanto con bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, aunque en general se las relaciona más a las primeras (Haake 2000). Basado en análisis de filogenia del ARN ribosomal 16S, el género *Leptospira* puede ser clasificado en tres grandes subgrupos (Lehmann et al. 2014). El primer subgrupo está constituido por las genoespecies saprófitas, microorganismos de vida libre no patogénicos para el hombre. En este grupo se incluye *Leptospira biflexa*. El segundo subgrupo está integrado por 8 genoespecies patogénicas, entre ellas *Leptospira interrogans* y *Leptospira borgpetersenii*. Por último, un tercer subgrupo reúne a todas las genoespecies de patogenicidad intermedia (Lehmann et al. 2014). El número de especies de *Leptospira* identificadas continúa en aumento, con más de 13 especies descritas recientemente (Puche et al. 2018; Thibeaux et al. 2018). Además de la clasificación molecular, existe una clasificación serológica, en serovares y serogrupos, definido por anticuerpos dirigidos contra sus antígenos lipopolisacáridos (LPS) (Goris & Hartskeerl 2014).

Patogénesis

Las especies patógenas de *Leptospira* tienen una afinidad particular y adaptaciones especiales a

distintos mamíferos hospederos, donde causan manifestaciones clínicas de distinto grado de severidad (Levett 2001). Los animales, pueden dividirse en hospederos reservorios o accidentales, pudiendo actuar como uno u otro dependiendo de cual sea el serovar de *Leptospira* infectante. Los seres humanos se consideran en general hospederos accidentales. La enfermedad es mantenida en la naturaleza por la infección crónica de los túbulos renales proximales de los hospederos reservorios. Un animal infectado puede permanecer libre de síntomas y excretar leptospiras en su orina durante toda su vida (Levett 2001). Los roedores actúan como reservorios de distintos serovares (Levett 2001).

Por otra parte, los animales de compañía, y el ganado, pueden sufrir desde abortos a lesiones múltiorgánicas graves. Los bovinos son hospederos reservorios de los serovares Hardjo y Wolfii, manteniendo las bacterias en el tracto urinario y reproductor, la infección crónica por estos serovares se asocia a problemas reproductivos. El serovar Pomona infecta accidentalmente a bovinos produciendo tormentas de abortos, y se mantiene como reservorio en suinos y ovinos. Manifestaciones sintomáticas de la enfermedad en el ganado bovino producen infertilidad y abortos tardíos, muerte en animales jóvenes, y puede provocar una disminución repentina y marcada de la producción láctea, fiebre, ictericia y meningitis (Ellis 2015; Radostits et al. 2002).

Los humanos infectados pueden presentar una amplia variedad de manifestaciones clínicas, desde infecciones asintomáticas a enfermedad crónica (Ashford et al. 2000; Ganoza et al. 2010). La leptospirosis humana es transmitida por el contacto directo de heridas con orina o tejidos de animales infectados o, indirectamente, a través del contacto de las mucosas con agua o suelos contaminados (Bharti et al. 2003; Palaniappan et al. 2007). La mayoría de las infecciones causadas

por leptospira son subclínicas o muy leves. En una proporción menor, se presenta como una enfermedad febril de inicio repentino que puede progresar hacia una falla multi-orgánica, e incluso la muerte (Adler et al. 2010). Entre el 5 y 10% de todos los pacientes con leptospirosis desarrollan el Síndrome de Weil, que es la manifestación más severa, con una tasa de mortalidad de 15-40% (Mišić-Majerus et al. 2017). En todos los casos, el riñón es uno de los órganos más afectados, ya que es donde se alojan las bacterias (Adler et al. 2010).

Los mecanismos subyacentes a la patogénesis de la leptospirosis no están del todo elucidados. Se cree que factores del patógeno y del hospedero, son ambos responsables del desarrollo y progresión de la infección. Sin embargo, es poco comprendido si el resultado final de las infecciones severas está dado por el daño tisular directo causado por *Leptospira* o es consecuencia de un desbalance de la respuesta inmune del hospedero a la infección. A su vez, que determina la infección aguda o crónica, dependiendo de la combinación hospedero y serovar de *Leptospira* también es poco comprendido. Numerosos estudios han reportado el papel de mediadores inmunes, como citoquinas y quimioquinas, en el curso de la enfermedad (Chin et al. 2018). Se cree que la interacción hospedero-patógeno es determinante en este sentido.

En lo que refiere a características propias del patógeno, las leptospiras han desarrollado diferentes estrategias para invadir los tejidos. Una de ellas es la capacidad de adherirse a las células del huésped y a la matriz extracelular, mediante la expresión de adhesinas (Vieira et al. 2014). Por otra parte, se ha observado que las leptospiras son capaces de ingresar eficientemente a las células del huésped *in vitro* y traslocarse rápidamente a través de las monocapas celulares (Vieira et al. 2014). Se considera que en *Leptospira* el principal factor de virulencia lo constituyen las lipoproteínas de

membrana externa, como las proteínas Loa22 y HptG (Ristow et al. 2007; King et al. 2013). Veamos ahora lo que sucede con la respuesta del hospedero frente a *Leptospira*.

Respuesta inmune innata

Leptospira puede ser reconocida por el sistema inmunitario. Como principal PAMP expresa, en su superficie celular, lipolisacárido (LPS). Este LPS posee un lípido A con una estructura diferente al de las enterobacterias, y una toxicidad disminuida. El LPS de *Leptospira* es reconocido por los heterodímeros TLR4/TLR2 en las células murinas, y, curiosamente, a través de los heterodímeros TLR2/TLR1 en humanos (Nahori et al. 2005; Werts 2010). El TLR4 es crucial para controlar la leptospirosis murina, ya que los ratones que no expresan TLR4 (C3H/HeJ) resultan susceptibles a la infección aguda por *L. interrogans* serovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni y Manilae; mientras que el resto de las cepas de ratones presentan diferentes grados de resistencia (Pereira et al. 1998; Viriyakosol et al. 2006; Koizumi 2003; Nally et al. 2005).

La detección de PAMPs y DAMPs, por NLRs, también ocurre durante la leptospirosis. El inflamasoma NLRP3 es inducido por la interacción del LPS bacteriano con los TLRs y activado por una disminución en la actividad de la ATPasa Na/K, efecto causado por una glicoproteína inhibidora de *Leptospira* (Burth et al. 1997; Lacroix-Lamande et al. 2012). Se sospecha que esta glicoproteína es un componente citotóxico de la membrana externa de la bacteria, y, previamente, se ha mostrado que es capaz de activar células mononucleares periféricas (Vinh et al. 1986; Diamant et al. 2002). DC-SIGN y la proteína de unión a manosa (MBL) son dos CLR's que han sido identificados también como potenciales mediadores del reconocimiento de *Leptospira* (Gaudart et al. 2008; Miranda et al. 2009).

El reconocimiento de *Leptospira* gatilla un programa robusto de inducción de citoquinas pro-inflamatorias, que es consistente para la infección en diversos mamíferos. El conjunto de citoquinas y quimioquinas inducidas en niveles significativos, tanto en humanos como en ratón, incluyen: IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1, y TNF- α (Wang et al. 2012). En el humano, también se encontraron niveles elevados en suero de GM-CSF, CCL2 e IL-11 (Wang et al. 2012). Por otra parte, se ha evidenciado, *in vitro*, la producción local de CXCL1/KC, iNOS, y CCL2/MCP-1 (Hung et al. 2006a, b; Yang et al. 2006).

En lo que refiere a la respuesta inmune, *Leptospira* presenta varias estrategias de evasión. Como mencionamos antes, el sistema del complemento juega un rol esencial en la respuesta inmune innata contra este tipo de bacterias, y la activación de la vía alternativa es uno de los mecanismos efectores más importantes durante las primeras horas de infección. Sin embargo, este mecanismo no resulta eficiente frente a las leptospiras. En estudios *in vitro* se ha observado que, mientras *L. biflexa* muere en pocos minutos en presencia de suero normal humano, las especies patógenas de *Leptospira* son capaces de sobrevivir y de resistir la acción lítica del sistema de complemento, especialmente si son virulentas (Fraga et al. 2016). Esta resistencia está vinculada a la capacidad de unir el factor H y la proteína 1 relacionada al factor H (FHR-1) (Fraga et al. 2016). Además, se han encontrado cepas patógenas resistentes al suero que son capaces de unir la proteína C4BP (Fraga et al. 2016).

Con respecto a la respuesta inmune innata celular, el LPS y las hemolisinas bacterianas estimulan a los macrófagos para producir IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α (Isogai et al. 1990; Wang et al. 2012).

Además, los macrófagos tratados con LPS de *Leptospira* presentan una actividad fagocítica mayor (Isogai et al. 1990). El papel de los macrófagos en la protección contra la infección por *Leptospira* se sugirió en un estudio en el que ratones tratados con sílice, para inhibir la función de los macrófagos, presentaron una eliminación de la bacteria deficiente y mayor susceptibilidad a la infección (Isogai et al. 1986). Varios estudios *in vitro* sugieren que la fagocitosis de las leptospiras por neutrófilos y macrófagos sólo es efectiva si el patógeno es primeramente opsonizado por anticuerpos IgG específicos, y que de lo contrario la fagocitosis es mínima o incluso inexistente (Banfi et al. 1982; Cinco et al. 1981; Vinh et al. 1982). La opsonización podría ayudar a superar mecanismos de evasión inmune, inherentes de *Leptospira*, que afectan la función de los macrófagos. Se ha demostrado que cepas virulentas pueden inducir la apoptosis de macrófagos o limitar la fusión de fagosomas cargados de bacterias con lisomas (Merien et al. 1997; Jin et al. 2009; Toma et al. 2011). Los leucocitos polimorfonucleares (PMN), incluyendo granulocitos, eosinófilos y neutrófilos, comprenden componentes importantes de la respuesta inmune innata, pero su papel en la protección contra la infección por *Leptospira* no está claro.

Algunos trabajos sugieren que las leptospiras podrían ingresar a los macrófagos en procesos mediados por fagocitosis, o de manera activa a través de mecanismos aún desconocidos, transformando a estas células en reservorios de bacterias. De hecho, algunos autores cuestionan si *Leptospira* puede ser considerada como un patógeno de vida completamente extracelular.

Respuesta inmune adaptativa

Los anticuerpos contra *Leptospira* tienen un papel clave en la provisión de protección inmune contra la infección letal por esta bacteria, en varias especies. Esto lo han demostrado varios

grupos, con experimentos donde ratones deficientes en células B mostraron una susceptibilidad mayor a la infección letal por *Leptospira*, siendo esto revertido por la administración de anticuerpos específicos (Adler & Faine 1977; Bandeira et al. 2011; Chassin et al. 2009; Nally et al. 2005). En contraste, las células T no parecen tener un efector protector, ya que ratones deficientes en células T mostraron ser resistentes al desafío letal (Chassin et al. 2009). La infección por *Leptospira* produce una respuesta humoral, con producción de inmunoglobulinas IgM e IgG específicas de serovar. La mayoría de los anticuerpos específicos producidos se dirigen contra el LPS, sin embargo, otros componentes de la membrana, como las lipoproteínas, también son antígenos importantes (Zuerner 2015).

Aunque lo descrito anteriormente muestra la importancia crítica de la inmunidad mediada por células B, tanto los linfocitos B como los T tienen un papel importante en la promoción de una respuesta inmune efectiva frente a la infección por *Leptospira*. De hecho, se ha mostrado una producción disminuida de IFN- γ , y mayor daño renal, con evidencia de inflamación intersticial y desarrollo de infiltrados nodulares, en ratones deficientes en células T (Chassin et al. 2009). Además, estos ratones mostraron un incremento de marcadores serológicos de daño renal (Chassin et al. 2009). Estos trabajos se centraron en la protección contra el desafío letal por *Leptospira*. Existe menos información sobre qué componentes de la respuesta inmunitaria son críticos para prevenir el desarrollo de infección crónica, por esta bacteria.

En lo que refiere a la inmunidad celular, se conoce que *Leptospira* activa los linfocitos T y las células renales parenquimales del riñón para producir IFN- γ e iNOS. Inicialmente, esto genera una inflamación, que es necesaria para atraer leucocitos y matar a las bacterias, pero se ha visto que

las células B y T también participan en procesos pro-inflamatorios, que son independientes de los TLRs, y que contribuyen al daño de los tejidos (Prêtre et al. 2011).

El papel de la respuesta inmune mediada por células T en la infección por *Leptospira* se ha puesto de manifiesto claramente en experimentos realizados en bovinos. En este sentido, vacunas polivalentes (incluyendo los serovares Hardjo, Canicola, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae), que están formuladas con bacterias enteras inactivadas, no son capaces de proteger de la infección por el serovar Hardjo, aunque son potentes inductores de inmunidad humoral (Bolin et al. 1989). Además, las vacunas monovalentes preparadas con *L. borgpetersenii* serovar Hardjo parecen estimular el sistema inmune celular, y de esta forma podrían mejorar la protección (Bolin et al. 2000; Bolin & Alt 2001; Ellis et al. 2000). La respuesta de células T CD4+ y T γ δ + productoras de IFN- γ se ha asociado a protección vacunal (Blumerman et al. 2007; Naiman et al. 2001b, 2002). En un estudio más reciente, mostraron que la inmunización con vacunas monovalentes induce respuestas de células T CD4+, CD8+ y T γ δ +. Si bien esas vacunas impidieron la colonización renal de los bovinos, y la liberación de bacterias por la orina, no lograron impedir la infección (Bolin et al. 2000; Bolin & Alt 2001; Ellis et al. 2000; Zuerner et al. 2011). En suma, la inmunidad celular parece jugar ciertamente un papel en controlar la infección por *Leptospira*, al menos en bovinos, pero aún permanecen varias preguntas sin responder en esta área.

La respuesta inmune innata y adaptativa están interconectadas mediante las células dendríticas, estas células son capaces de reconocer bacterias a través de la unión de PAMPs a receptores especializados en su superficie. Luego de capturar y degradar a la bacteria, las DCs presentan sus antígenos como péptidos unidos a moléculas de MHC y activan células T vírgenes específicas. La caracterización de las

interacciones DC-bacteria es importante para entender los mecanismos utilizados por las bacterias virulentas para evitar la inmunidad adaptativa. Cualquier impedimento en la función de estas células puede contribuir a la supervivencia y diseminación de la bacteria en el individuo. Un ejemplo de un patógeno capaz de interferir con la función de las DCs es *Salmonella* entérica serovar Typhimurium (*S. typhimurium*). Cepas virulentas de esta bacteria son capaces de modular su entrada a las DCs, evitar la degradación lisosomal y prevenir su presentación en moléculas de MHC, a través de la expresión de proteínas de virulencia. En lo que respecta a *Leptospira* se conoce muy poco de su interacción con las células dendríticas, con un único artículo en el que se muestra que *L. interrogans* se une a estas células a través del receptor DC-SIGN e induce la maduración y liberación de citoquinas por las mismas (Gaudart et al. 2008).

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar *Leptospiras* recombinantes para el antígeno modelo OVA
- Evaluar la respuesta de células T CD4+ inducida frente a *Leptospira in vitro*
- Estudiar el procesamiento y la presentación de antígenos de *Leptospira* por células dendríticas derivadas de médula ósea murina
- Determinar el rol de Tmem176b en la presentación de antígenos de *Leptospira*, la respuesta celular a la bacteria y el curso de la infección, en un modelo de ratón

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Oligos utilizados

Para los ensayos realizados se utilizaron los oligos de la Tabla 3.1.

| Tabla 3.1. Oligos utilizados en este estudio. | |
|---|---|
| PCR convencional | |
| FlgB1 | 5'-ACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTAATCTTTTAAATTTAGCACTTCA-3' |
| FlgB2 | 5'-CAAAGTTGATTATACTTTCTAACATTTTCTCAAACATTATTTCTCCCCCT-3' |
| OFGP1 | 5'-AGGGGGAGAAATAATGTTTGAGAAAATGTTAGAAAGTATAATCAACTTTG-3' |
| OGFP2 | 5'-CATTTGTGGGAATATGCTATACGGATTTGCCCTATTTGTAGAGCTCATCCATGCC-3' |
| Mao1 | 5'-CGCAATTAACCCTCACTAAAG-3' |
| Mao2 | 5'-ATTATTCCACATATATTCTGTC-3' |

3.3.2. Generación del vector de expresión pMaORI-OVA-GFP

Se generó el vector de expresión en *Leptospira spp.* pMaORI-OVA-GFP conteniendo las secuencias codificantes para dos péptidos OVA, fusionados a la proteína GFP, bajo el promotor de la proteína de *Leptospira* FlgB, mediante clonado libre de enzimas de restricción. El vector pMaORI conteniendo un cassette de resistencia al antibiótico espectinomicina (SpCR) fue proporcionado por Mathieu Picardeau de la Unidad de Biología de Espiroquetas, Institut Pasteur.

Amplificación del promotor de FlgB de *Leptospira spp.*

Para el clonado del promotor de FlgB se partió de ADN genómico de *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, disponible en la Unidad Mixta INIA-Pasteur. Se utilizaron los

oligos FlgB1 y FlgB2 para la amplificación por PCR, de acuerdo al protocolo descrito más adelante, utilizando una Tm de 55 °C. El oligo FlgB1 contiene una región complementaria al vector pMaORI y una específica para la secuencia del promotor, mientras que el oligo FlgB2 contiene una región específica del promotor y otra complementaria a la secuencia de OVA. El producto de PCR se corrió por electroforesis en gel de agarosa y a partir de la banda del tamaño esperado para la secuencia del promotor se purificó el ADN amplificado.

Amplificación de la secuencia OVA-GFP

Se amplificó la secuencia codificante para la proteína GFP fusionada a los siguientes péptidos OVA: OVA257-264 SIINFEKL, cargado en el MHC de clase I y reconocido por células T CD8+; y OVA323-339 ISQAVHAAHAEINEAGR cargado en el MHC de clase II y reconocido por células T CD4+; a partir del plásmido pCINeo-OGFP, gentilmente cedido por Cédric Louvet. Se utilizaron los oligos OGFP1 y OGFP2 y se siguió el protocolo de amplificación descrito más adelante. El oligo OGFP1 contiene una secuencia complementaria al producto de amplificación del promotor de FlgB y una específica para la secuencia de OVA, mientras que el oligo OGFP2 contiene una región específica para la secuencia de GFP y una complementaria al vector pMaORI (Pappas et al. 2015). El producto de PCR se corrió por electroforesis en gel de agarosa y a partir de la banda del tamaño esperado para la secuencia OVA-GFP se purificó el ADN amplificado.

Generación del megaprimer

La generación de un megaprimer conteniendo la secuencia del promotor de FlgB seguida de la secuencia codificante para la proteína de fusión OVA-GFP, con regiones que permitieran su inserción en el vector pMaORI, se logró realizando una reacción de extensión. Para esto se siguió el

mismo protocolo de ciclado de PCR, descrito más adelante, en una reacción en la que se colocó el ADN, purificado a partir del gel, producto de la amplificación del promotor de FlgB y el producto de la amplificación de la secuencia codificante para OVA-GFP. Como se mencionó antes, los oligos utilizados para las amplificaciones fueron diseñados de manera tal que ambos productos de PCR contuviesen regiones complementarias entre sí. El producto de la reacción de extensión se corrió por electroforesis en gel de agarosa y se purificó ADN a partir de una banda del tamaño esperado para el megaprimer.

Extensión del megaprimer

Se preparó una reacción de PCR de 50 μ L de volumen final, donde se colocaron 200 ng del megaprimer, $MgCl_2$ a 3 mM, dNTPs a 0.2 mM, buffer 1x HF, 0.2 μ L de la enzima Phusion y 40 ng del plásmido pMaORI, utilizado como molde. El siguiente programa de PCR fue utilizado para la extensión: paso 1, 3 min a 98 °C; paso 2, 15 seg a 98 °C; paso 3, 30 seg a 55 °C; paso 4, 2 min a 72 °C; paso 5, repetir los pasos 2-4 (35x); paso 6, extensión final por 5 min a 72 °C. Luego, se realizó la digestión del plásmido parental metilado utilizado como molde. Para esto se agregó 1 μ L de la enzima Dpn I a 50 μ L de reacción de PCR y se incubó por 1 h a 37 °C, transcurrido este tiempo se inactivó la enzima incubándola 15 minutos a 65 °C. El producto de la reacción se purificó utilizando el kit de purificación de ADN QIAquick PCR Purification Kit (Nro. Ref. 28106, Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se resuspendió el producto final en 30 μ L de agua. 10 μ L del ADN purificado se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cada reacción de PCR consistió de dos oligos (forward y reverse) a 10 nM final, buffer HF 1X, 1 μ L

de ADN molde, $MgCl_2$ a 3 mM, dNTPs a 0.2 mM, 0.2 μ L de la enzima Phusion y ddH₂O hasta un volumen final de 50 μ L. El siguiente programa de PCR fue utilizado para la amplificación: paso 1, 3 min a 98 °C; paso 2, 15 seg a 98 °C; paso 3, 30 seg a 60 °C; paso 4, 1 min a 72 °C; paso 5, repetir los pasos 2-4 (35x); paso 6, extensión final por 5 min a 72 °C.

3.3.4. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de ADN a partir del gel

Los geles de agarosa fueron preparados disolviendo agarosa, apta para biología molecular, a una concentración de 1% (m/v) en buffer TAE utilizando un horno microondas. Luego de dejar enfriar levemente se agregó bromuro de etidio como agente intercalante. Se colocaron 0.5 μ g de ADN por carril junto con buffer de carga y se corrió a 100 V por 1 hora. Luego se visualizó el gel utilizando un transiluminador ultravioleta.

En caso de ser necesario se realizó la extracción de ADN a partir de las bandas del gel para futuras aplicaciones. Las bandas requeridas fueron extraídas utilizando un bisturí y el ADN fue purificado utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.3.5. Preparación de bacterias competentes *Escherichia coli* π 1 y β 2163 para transformación

Se creció un cultivo de 100 ml de bacterias *E. coli* π 1 o β 2163 en medio LB con dT 0.3 mM o DAP 0.3 mM, respectivamente, a partir de un inóculo de bacterias congeladas. Se enfriaron las células en hielo y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Luego se resuspendieron en 10 ml de buffer TSS conteniendo LB, PEG3350 al 10%, $MgSO_4$ 1/50 y DMSO 5%. Las células se alicuotaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -80 °C.

3.3.6. Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico

Para transformar las bacterias, primero se descongeló una alícuota de las células competentes en hielo. Se preparó un tubo conteniendo 20 μ L de KCM 5X, 5 μ L del ADN plasmídico purificado y ddH₂O hasta un volúmen final de 100 μ L. A este tubo se le agregaron 100 μ L de las células competentes, se mezcló y se incubó en hielo por 20 minutos. Se realizó un shock térmico por transferencia de las células a 37 °C durante 5 minutos. Se agregó 1 ml de LB-dT 0.3 mM o LB-DAP 0.3 mM, según corresponda, y se incubó a 37 °C por una hora. Transcurrido este tiempo se plaquearon las células en medio selectivo LB agar-dT 0.3 mM/DAP 0.3 mM-espectinomicina 50 μ g/mL y se incubaron o.n. a 37 °C.

3.3.7. Purificación de ADN plasmídico

Para las distintas purificaciones de ADN plasmídico colonias únicas de bacterias *E. coli* π 1 o β 2163 transformadas fueron crecidas toda la noche a 37 °C, con agitación, en medio LB conteniendo espectinomicina 50 μ g/ml y dT 0.3 mM o DAP 0.3 mM, según corresponda. La purificación del ADN plasmídico se realizó por miniprep utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Nro. Ref. 27106, QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. El producto final se resuspendió en 30 μ L de agua y se cuantificó el ADN por Nanodrop.

3.3.8. Digestión con enzimas de restricción

Se digirió el ADN plasmídico utilizando la enzima de restricción Kpn I para evaluar la presencia del inserto. Para esto se incubó 1 μ g de plásmido pMaORI-OVA-GFP o pMaORI sin inserto, como

control, con 2 μL de buffer Fast Digest 10X, 1 μL de la enzima Kpn I Fast Digest y agua hasta un volumen final de 20 μL , por 30 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se inactivó la enzima calentándola a 80 °C por 5 minutos. El producto de digestión se corrió por electroforesis en gel de agarosa.

3.3.9. Secuenciación del plásmido pMaORI-OVA-GFP

Se enviaron para su secuenciación, 2 μg de ADN del producto de miniprep de dos clones de bacterias $\pi 1$ transformadas con el plásmido pMaORI, de las cuales se sospechaba, por el ensayo de digestión con Kpn I, que contenían el inserto OVA-GFP. El secuenciado fue realizado por la plataforma de secuenciación Eurofins. Los oligos Mao1 y Mao2 (ver **Tabla 3.1**) fueron utilizados para la secuenciación de ambas hebras. Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa Plasm4 y se compararon por BLAST con la secuencia esperada para el inserto promFlgB-OVA-GFP.

3.3.10. Transformación de *Leptospira* spp. por conjugación con *E. coli* $\beta 2163$

Se crecieron cultivos de *L. biflexa* serovar Patoc I (LBP) y *L. interrogans* serovar Manilae (LIM) en medio EMJH líquido a 30 °C con agitación y se siguieron por microscopía de campo oscuro. Se dejaron crecer hasta que los mismos alcanzaron una densidad óptica (DO) a 420 nm de 0.3-0.4. Por otra parte se crecieron cultivos, a partir de stocks congelados de bacterias $\beta 2163$, transformadas con el plásmido pMaORI-OVA-GFP, en medio EMJH complementado con DAP 0.3 mM a 37 °C hasta alcanzar una DO de aproximadamente 0.3. Luego, se conectó un dispositivo de filtración, con un filtro de 0.1 μm , a una bomba de vacío. A través de este dispositivo se pasaron primero 500 μL del cultivo de *E. coli* y luego 2-6 ml del cultivo de *Leptospira* correspondiente. Se removió el filtro y se colocó en una placa de EMJH agar-DAP 0.3 mM o.n. a 30 °C, para permitir la conjugación.

Al día siguiente, se resuspendieron las bacterias presentes en el filtro en 800 μL de EMJH, se corroboró la presencia de ambas bacterias por visualización al microscopio y se plaquearon 250 μL de la suspensión de bacterias en placas de EMJH agar-espectinomicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las placas se incubaron a 30 °C hasta observar el crecimiento de colonias de *Leptospira* spp, aproximadamente una semana para *L. biflexa* y tres semanas para *L. interrogans*. Las colonias observadas se crecieron en medio EMJH- espectinomicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la posterior extracción de ADN y confirmación de la presencia del plásmido pMaORI-OVA-GFP.

3.3.11. Extracción de ADN de *Leptospira* spp.

La extracción de ADN total de *Leptospira* se realizó a partir de 300 μL de un cultivo en fase exponencial por Maxwell, de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. El ADN extraído se recuperó en 300 μL de agua miliQ.

3.3.12. Amplificación del plásmido pMaORI-OVA-GFP a partir de ADN de *Leptospira* spp.

Para confirmar la presencia del plásmido pMaORI-OVA-GFP en las leptospiras transformadas se amplificó una secuencia del mismo mediante PCR, a partir del ADN extraído antes, usando los oligos Mao1 y Mao2. El ADN extraído de cultivos de bacterias salvajes se utilizó como control. Y el plásmido pMaORI-OVA-GFP se utilizó como control positivo. Se preparó una reacción de PCR de 50 μL de volumen final, donde se colocaron los oligos Mao1 y Mao2 a 0.5 mM, MgCl_2 a 3 mM, dNTPs a 0.2 mM, buffer 1x HF, 0.2 μL de la enzima Phusion y 40 ng de ADN. El siguiente programa de PCR fue utilizado para la extensión: paso 1, 3 min a 98 °C; paso 2, 15 seg a 98 °C; paso 3, 30 seg a 48 °C;

paso 4, 1 min a 72 °C; paso 5, repetir los pasos 2-4 (35x); paso 6, extensión final por 5 min a 72 °C.

Se corrieron 5 µL del producto de PCR en una electroforesis en gel de agarosa.

3.3.13. Wester Blot anti-GFP

Se generaron lisados celulares a partir de cultivos de *L. biflexa* o *L. interrogans* salvajes o transformadas con el plásmido pMaORI-OVA-GFP. Para esto se resuspendió un pellet seco congelado de estas células en buffer de lisis con 1% de SDS e inhibidor de proteasas (Pierce), y a continuación se sonicaron las muestras. 20 µg de proteína total fueron migrados por electroforesis en un gel de poliacrilamida 12% a 150 V, en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Previo al sembrado, las muestras se diluyeron en buffer de carga (β -mercaptoetanol 25%, SDS 2.5%, Glicerol 50%, Buffer Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, Azul de bromofenol 0.1 mg/mL) y se calentaron a 100 °C por 10 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Se realizó una electrotransferencia húmeda del gel a una membrana de PVDF, previamente activada con metanol, a 20 V por 1 hora. La membrana se lavó con TBS 1x y se bloqueó con una solución de TBS-Leche en polvo 5%-Tween 20 0.1% o.n. a 4°C bajo agitación. A continuación se incubó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFP (Sigma) diluido 1/1000 en TBS-Tween 20 0,1%-Leche en polvo 5% por 2 h a temperatura ambiente (TA). Luego, se lavó la membrana y se incubó durante 1 h a TA con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (PROMEGA) diluido 1/2500 en TBS-Tween 20 0,1%-Leche en polvo 5%. Por último, se lavó la membrana nuevamente y se reveló con ECL (SuperSignal West Pico, Thermofisher Scientific).

3.3.14. Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs)

Para la obtención de BMDCs, se extrajo médula ósea del fémur y la tibia de ratones *Tmem176b*^{+/+} o *Tmem176b*^{-/-}, se lisaron los glóbulos rojos y se colocaron 5×10^6 células en 10 mL de medio completo con 1 μ L de GM-CSF por placa de petri. El medio para estas células fue RPMI complementado con 10% de SFB, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 10 unidades/ml, estreptomina 10 μ g/ml, HEPES 10 mM, MEM-aminoácidos no esenciales 1x y β -mercaptoetanol 0.02 mM. Al tercer día de comenzando el cultivo se agregaron 10 ml de medio completo con 1 μ L de GM-CSF por placa. Luego, al día 6, se extrajeron 10 ml de medio por placa, se centrifugó y se resuspendieron las células en 10 mL de medio fresco complementado con 1 μ L de GM-CSF y se volvieron a depositar en la placa. Al día 8 se despegaron las células adherentes con PBS-2% SFB-0.7 mM EDTA frío para su posterior utilización.

3.3.15. Ensayos de proliferación de células OT-II

Preparación de las bacterias

Se realizaron cultivos de *L. biflexa* y *L. interrogans* salvajes y recombinantes para OVA en medio EMJH-espectinomicina 50 μ g/ml a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial, DO a 420 nm de 0.2-0.3. Las células se centrifugaron por 10 minutos a 5000 rpm y se lavaron 2 veces con PBS 1x. Luego de los lavados se resuspendieron en medio RPMI y se contaron en cámara de Petroff-Hausser. La viabilidad de las bacterias se verificó observando su movilidad al microscopio.

Purificación de células T CD4+ de ratones OT-II y marcado con DDAO

Células T CD4+ fueron purificadas por selección positiva mediante MACS a partir del bazo de

ratones transgénicos OT-II. Primero, se realizó una disgregación mecánica del bazo, se centrifugaron las células y se lisaron los glóbulos rojos. A partir de la suspensión celular obtenida se procedió a la purificación de las células T CD4⁺ utilizando el kit CD4⁺ T cell Isolation Kit para ratón (Miltenyi Biotec), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las células purificadas fueron cargadas con la sonda fluorescente DDAO y contadas en cámara de Malassez.

Infección de BMDCs con *Leptospira* spp

BMDCs Tmem176b^{+/+} o Tmem176b^{-/-} fueron generadas como se describió anteriormente. A día 8 se despegaron y se colocaron 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se dejaron adherir por 1 hora y se lavaron con medio RPMI para eliminar posibles restos de antibiótico. *L. biflexa* o *L. interrogans*, salvajes o recombinantes para OVA, en medio RPMI se incubaron con las BMDCs a multiplicidades de infección (MOI) de 1, 10, 100 y 200 por 3 horas, para permitir la infección. BMDCs sin bacterias fueron utilizadas como control. Para realizar los ensayos de proliferación en respuesta al péptido OVA, las BMDCs se incubaron con las bacterias salvajes a una MOI de 100 y péptido OVA de clase II a 1 y 10 µg/ml, durante 3 h. Transcurrido este tiempo, las BMDCs se lavaron y se colocó medio RPMI completo con gentamicina a 100 µg/ml para eliminar las bacterias que pudieran quedar adheridas.

Incubación de BMDCs con células T OT-II y medida de proliferación

Las células OT-II purificadas y cargadas con la sonda se incubaron con las BMDCs previamente infectadas y lavadas en un ratio 5:1 (OTII:BMDCs), durante 3 días a 37 °C en medio RPMI completo. Transcurrido este tiempo la proliferación de células T CD4⁺ fue evaluada por dilución del DDAO mediante citometría de flujo. Las células se marcaron con anticuerpos anti-TCR y anti-CD4 y se

adquirieron utilizando el citómetro Accuri C6 (BD). El porcentaje de células DDAOlow se determinó dentro de las células T CD4+ utilizando el software FlowJo (BD) y se normalizó a la situación sin bacterias. Las bacterias salvajes fueron utilizadas como control de proliferación específica de OVA.

3.3.16. ELISA IFN- γ e IL-10

El sobrenadante de cultivo de los ensayos de proliferación fue guardado a -20 °C para la evaluación de citoquinas mediante ELISA. La presencia de IFN- γ e IL-10 se midió en las muestras de sobrenadante de los co-cultivos de células OT-II con BMDCs infectadas por *Leptospira*, a una MOI de 100, utilizando kits comerciales (BD), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

3.3.17. Maduración de BMDCs en respuesta a *Leptospira* spp

Se generaron BMDCs WT como se describió anteriormente. A día 8 las células se despegaron y se colocaron 500.000 células en placas de 10 mm no tratadas, se dejaron adherir por 2 h en medio RPMI completo, y transcurrido este tiempo se lavaron y se colocaron en medio RPMI sin antibiótico. Las células se co-incubaron con LBP o LIM, a una MOI de 100. Las bacterias fueron preparadas como se describe en los ensayos de proliferación. Luego de 48 hs las BMDCs se despegaron y se marcaron con anticuerpos anti-MHCII, anti-CD80 y anti-CD86, se fijaron y se adquirieron en el citómetro de flujo Accuri C6 (BD). El análisis se realizó utilizando el software FlowJo.

3.3.18. Medida del pH fagolisosomal

Cargado de las bacterias

Se realizaron cultivos de LBP y LIM en medio EMJH a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial, DO a 420 nm de 0.2-0.3. Las células se centrifugaron por 10 minutos a 5000 rpm y se lavaron 2 veces con PBS 1x. Luego se resuspendieron a una concentración de 1×10^9 bacterias/ml en PBS. Se mezcló 1 ml de suspensión con 1 μ L de Alexa Fluor 647 y 25 μ L de FITC, a partir de un stock en DMSO de las sondas a 10 mg/ml. Las bacterias se incubaron en oscuridad bajo agitación suave por 2 h a temperatura ambiente. Se frenó el marcado a través del agregado de 4 ml de PBS-BSA 1%, se centrifugaron las bacterias y se realizaron dos lavados con PBS-BSA 0.2%. Finalmente se resuspendieron en medio RPMI, se verificó su viabilidad al microscopio, y se contaron en cámara de Petroff-Hausser.

Incubación de BMDCs con las bacterias marcadas

Se generaron BMDCs WT y *Tmem176b*^{-/-}, como se describió anteriormente. A día 8 las células se despegaron, se colocaron 500.000 células en placas de 10 mm no tratadas, y se dejaron adherir por 2 h en medio RPMI completo. Transcurrido este tiempo se lavaron y se colocó medio RPMI sin antibiótico. Para sincronizar la fagocitosis las células se colocaron en hielo dentro de una cámara fría por 15 minutos. Se agregaron las bacterias a una MOI de 10 y se colocaron las células nuevamente en hielo por 30 minutos, de manera de sincronizar la unión de las bacterias a las células. Luego, se colocaron a 37 °C por 30 minutos para permitir la fagocitosis, se lavaron las células y se agregó medio RPMI completo con gentamicina. Las células se incubaron a 37 °C por 2 h y pasado este tiempo se frenó la acidificación mediante el agregado de PBS-EDTA 5 mM frío. Se lavó 2 veces con PBS-EDTA 5 mM y por último se colocó PBS. Las células se despegaron mecánicamente y se transfirieron a tubos de citometría fríos. Las células se adquirieron inmediatamente a 4 °C utilizando el citómetro FACSArea FusionIII (BD). El análisis se realizó

utilizando el software FlowJo.

Curva de calibración

Para preparar la curva estándar se frenó la acidificación luego de 2 h, se lavaron las células, se levantaron y se transfirieron a tubos de citometría, como se describió anteriormente. Las BMDCs se centrifugaron a 500 xg por 7 minutos y se resuspendieron en buffers de pH conocidos entre 5 y 9, con ionóforos, para favorecer la permeabilización del fagolisosoma. Las células se incubaron por 10 minutos previo a su adquisición para permitir que se equilibrará el pH del fagosoma con el del buffer. Se realizó una curva de calibración independiente para cada bacteria.

3.3.19. Infección con *L. interrogans* en modelo murino

El protocolo de infección experimental se ejecutó en cumplimiento de las normativas vigentes en lo que respecta al uso de animales de experimentación, según el protocolo 009-13 aprobado por la CEUA del Insitut Pasteur.

Se realizaron cultivos de LIM salvaje o recombinante para OVA en medio EMJH a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial, DO a 420 nm de 0.2-0.3. Se centrifugaron las bacterias a 4000 xg por 25 minutos a temperatura ambiente, se resuspendieron en PBS y se contaron en cámara de Petroff-Hausser. Hembras C57B6 Tmem176b^{+/+} o Tmem176b^{-/-} de 8-10 semanas fueron infectadas por vía intraperitoneal con un único inóculo de 1×10^7 bacterias LIM salvajes o recombinantes para OVA, en PBS. Los ratones infectados fueron mantenidos en un aislador y monitoreados hasta su sacrificio, 15 días post infección. Al momento del sacrificio, se recuperó sangre para la medida de

citoquinas y anticuerpos en suero, y se congelaron en nitrógeno líquido fragmentos de riñón y bazo para su almacenamiento a -80 °C y posterior utilización.

3.3.20. Estudios histológicos

Al momento de sacrificio se cortaron transversalmente los riñones de los ratones infectados y control y se colocó un polo de ambos riñones de cada ratón en una solución de formalina tamponada. Estas muestras fueron enviadas para la realización de análisis histológicos y de inmunohistoquímica a la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela.

Histología

Cada una de las muestras de riñón fueron seccionadas transversalmente y posteriormente en forma longitudinal, incluyéndose 3 secciones por cada riñón (6 por ratón) en histosettes para procesamiento histológico. De esta forma, se dispuso para examen histológico de 6 secciones de similares dimensiones de riñón por ratón, cada una de las cuales incluyó corteza y médula renal. Se registraron las lesiones individualmente para cada riñón de cada ratón. El procesamiento histológico se realizó en forma rutinaria, embebiéndose los tejidos en parafina, seccionándolos a 4-5 µm de espesor con micrótopo, coloreándolos con hematoxilina y eosina (H/E), para examen con un microscopio óptico (Axio Scope.A1, Carl Zeiss), equipado con una cámara digital (AxioCam 512 color, Carl Zeiss) comandada por el software ZEN (Carl Zeiss), lo que permitió documentar los cambios histológicos mediante microfotografías.

Realizando una adaptación de una metodología previamente descrita (Matsui et al. 2016), se

realizó una graduación de la severidad de los cambios histológicos para cada uno de los riñones examinados. Este examen permitió registrar cambios histológicos en el intersticio, túbulos y glomérulos renales, que fueron categorizados usando una escala individual de 5 grados (entre 0 y 4), según se indica a continuación: 0- sin cambios histológicos relevantes, 1- cambios histológicos mínimos (no considerados lesiones significativas), 2- lesiones leves a moderadas y localizadas o multifocales/ diseminadas (consideradas lesiones de significancia), 3- lesiones severas y localizadas o multifocales/ diseminadas, y 4-lesiones severas difusas. Se evaluaron los siguientes cambios histológicos: i- infiltrado inflamatorio intersticial (incluyendo los tipos de células inflamatorias), ii- infiltrado inflamatorio en la luz de los túbulos renales (incluyendo túbulos corticales y medulares, así como los tipos de células inflamatorias), iii- dilatación y proteinosis tubular, iv- apoptosis/necrosis de células epiteliales de túbulos corticales, v- fibrosis, vi- hemorragia y vii- edema. Así, el mínimo score posible de daño para cada riñón fue de 0 puntos, y el máximo score posible fue de 28 puntos.

Inmunohistoquímica

Se realizó, en tres corridas distintas, inmunohistoquímica para detección de antígenos de *Leptospira spp.* en secciones seriadas de los mismos bloques de riñón parafinado usados para el examen histológico. Esta técnica se realizó individualmente para cada ratón, incluyendo las 6 secciones de ambos riñones para cada uno de los animales. La técnica se realizó siguiendo un procedimiento operativo estandarizado, provisto gentilmente por la histotecnóloga Karen Sverlow, del laboratorio de histología del “California Animal Health and Food Safety (CAHFS) Laboratory System”, de la “University of California, Davis”. Resumidamente, las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas, y se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al

3% por 10 minutos. No se aplicó ningún método de recuperación antigénica. Como anticuerpo primario se utilizó un suero de conejo disponible comercialmente (*Leptospira* multivalent fluorescent antibody conjugate, #LEP-FAC, National Veterinary Services Laboratories -NVSL-, United States Department of Agriculture -USDA-, Ames, Iowa) a una dilución de 1/5000. Como anticuerpo secundario se usó suero anti-conejo producido en cabra, conjugado con un polímero marcado con peroxidasa de rábano (EnVision+ System HRP, Dako, #K4003, Carpinteria, CA, USA), y la solución de cromógeno/sustrato con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, Dako, #K3464, CA, California, USA). Secciones seriadas del mismo riñón, a las que no se les aplicó anticuerpo primario, sino suero normal de conejo (Biocare Medical #NC499H, Pacheco, CA, USA) en su lugar, se utilizaron como controles negativos. Se usó hematoxilina como contracoloración.

En las 3 corridas se apreció inmunomarcación en las luces tubulares en los controles positivos, y no se apreció inmunomarcación en los controles negativos, determinándose así la validez de la prueba. Para la lectura microscópica, la intensidad y frecuencia de la inmunomarcación, se graduó en una escala de 4 grados, siendo el grado 0 negativo (-), y los grados 1 a 3 (+, ++, +++) grados crecientes de frecuencia de la inmunomarcación. Histológicamente esto fue determinado principalmente en la luz tubular y superficie apical de las células epiteliales de los túbulos corticales. La graduación de la inmunomarcación fue realizada sin tener en cuenta al momento de la lectura, el grado de lesiones histológicas encontrado en cada ratón. Todos los análisis fueron realizados con SAS Studio v3.6 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Construcción del vector pMaORI-OVA-GFP

Se generó, mediante clonado libre de enzimas de restricción, un vector de expresión replicativo en *Leptospira spp.* al que llamamos pMaORI-OVA-GFP. El plásmido pMaORI, que usamos como vector de clonado, es el primer plásmido descrito que es replicativo tanto en *L. biflexa* como en *L. interrogans* (Pappas et al. 2014). Dentro de este vector se clonó una secuencia codificante para dos péptidos mínimos de la proteína OVA: OVA257-264 y OVA323-339, que pueden ser cargados en el MHC de clase I y en el MHC de clase II, para su reconocimiento por células T CD8+ y T CD4+, respectivamente, fusionados al gen de la proteína fluorescente GFP. Para lograr su expresión en *Leptospira spp.*, se colocaron bajo el promotor de la proteína de expresión constitutiva, FlgB.

En primer lugar, se amplificó mediante PCR la secuencia del promotor de la proteína FlgB, a partir de ADN genómico de *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Por otra parte, mediante PCR también, se amplificó una secuencia de ADN codificante para los péptidos OVA y la proteína GFP, a partir del plásmido PCINeo-OGFP. Los primers utilizados para estos clonados fueron diseñado de manera tal que ambos productos de PCR tuvieran una región de complementariedad entre ellos y permitieran la posterior inserción en el vector pMaORI. Con los productos promFlgB y OVA-GFP, purificados a partir de un gel de electroforesis, se realizó una reacción de extensión, para generar el megaprimer promFlgB-OVA-GFP. El producto de esta reacción se corrió por electroforesis en gel de agarosa, comprobándose la obtención de un fragmento de ADN del tamaño esperado para el megaprimer.

Por último, se realizó una reacción final de extensión del megaprimer sobre el vector pMaORI, y la

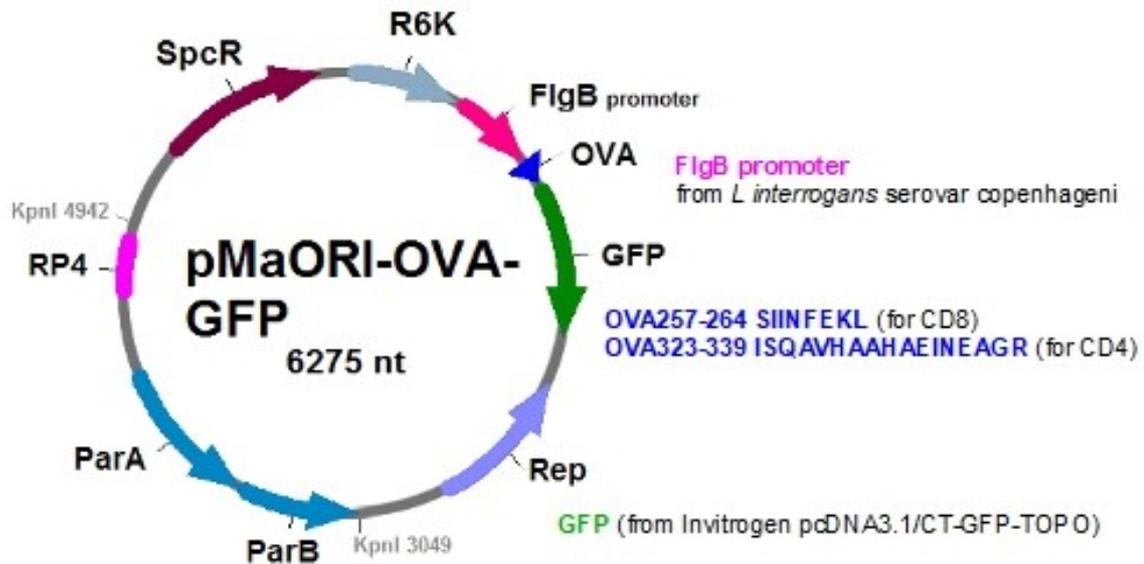


Figura 3.2. Diseño del vector de expresión en *Leptospira* spp pMaORI-OVA-GFP. Se generó el vector de expresión en *Leptospira* spp. pMaORI-OVA-GFP conteniendo las secuencias codificantes para dos péptidos OVA, fusionados a la proteína GFP, bajo el promotor de la proteína de *Leptospira* FigB, mediante clonado libre de enzimas de restricción. Para el clonado del promotor de FigB se partió de ADN genómico de *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Se amplificó la secuencia codificante para la proteína GFP fusionada a los siguientes péptidos OVA: OVA257-264 SIINFEKL, cargado en el MHC de clase I y reconocido por células T CD8+; y OVA323-339 ISQAVHAAHAEINEAGR cargado en el MHC de clase II y reconocido por células T CD4+; a partir del plásmido pCINeo-OGFP.

digestión del plásmido parental, para obtener el plásmido de interés pMaORI-OVA-GFP (**Figura 3.2**). El producto de esta reacción se utilizó para transformar bacterias quimiocompetentes *E. coli* de la cepa π 1, mediante shock térmico, para la amplificación y posterior purificación por miniprep del plásmido. La cepa π 1 de *E. coli* es utilizada para la amplificación del plásmido pMaORI ya que el mismo se encuentra en un número de copias alto en estas células. Estas bacterias dependen para su crecimiento de la administración de dT. Las bacterias transformantes se seleccionaron mediante plaqueo en medio LB agar-dT con espectinomicina, antibiótico para el cual el plásmido pMaORI contiene un gen de resistencia. De las colonias resistentes al antibiótico se crecieron diez de ellas en medio selectivo, y a partir de estos cultivos se purificó el ADN plasmídico mediante miniprep.

El producto de miniprep se cortó con la enzima de restricción Kpn I y se corrió por electroforesis

junto con el producto de digestión del plásmido pMAORI parental. Los productos de digestión de los plásmidos obtenidos de las bacterias transformadas presentaron un tamaño mayor al del producto de la digestión del plásmido pMaORI parental, sospechándose la presencia del inserto OVA-GFP en los plásmidos provenientes de todas las colonias testeadas. De estas, se eligieron dos para secuenciación, confirmándose efectivamente la presencia del inserto OVA-GFP, bajo el promotor de FlgB, en el sitio adecuado del vector pMaORI, y con la secuencia correcta. Se guardó un stock de las bacterias *E. coli* transformadas con estos plásmidos en glicerol a -80°C.

3.4.2. Transformación de *L. biflexa* serovar Patoc I (LBP) y *L. interrogans* serovar Manilae (LIM) con el plásmido pMaORI-OVA-GFP

Para realizar la transformación se debió transferir el plásmido de la cepa de *E. coli* π 1 a la β 2163, que es la que permite la conjugación con *Leptospira*. Se utilizó el plásmido pMaORI-OVA-GFP, purificado por miniprep de los cultivos de bacterias *E. coli* π 1 transformadas y secuenciadas, para transformar bacterias quimiocompetentes *E. coli* de la cepa β 2163 por shock térmico. Las bacterias *E. coli* β 2163 transformadas con el plásmido se seleccionaron por crecimiento en medio selectivo LB agar-espectinomicina-DAP. Se obtuvieron colonias transformadas, algunas de las cuales se crecieron en medio líquido LB-espectinomicina-DAP. A partir de los cultivos se generaron stocks en glicerol a -80°C y se purificó el ADN plasmídico mediante miniprep. El producto de miniprep se digirió con la enzima de restricción Kpn I y se corrió por electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia del plásmido con el inserto en estas bacterias. Si bien esto es difícil, ya que el plásmido pMaORI se encuentra en baja copia en esta cepa, se logró evidenciar la presencia del mismo.

Las bacterias *E. coli* cepa β 2163 conteniendo el plásmido pMaORI-OVA-GFP se utilizaron para transformar, mediante conjugación, *Leptospira biflexa* serovar Patoc I y *Leptospira interrogans* serovar Manilae. Luego de una incubación O.N. de las bacterias *E. coli* y *Leptospira* en medio EMJH agar-DAP, para permitir la conjugación, se plaquearon en medio selectivo EMJH agar-espectinomicina y se colocaron en cultivo hasta observar la presencia de colonias. La ausencia de DAP hace que las bacterias *E. coli* β 2163, auxótrofas para el mismo, no puedan crecer, y la espectinomicina determina que solo puedan sobrevivir aquellas leptospiras que contengan el plásmido pMaORI-OVA-GFP.

Luego de una semana de cultivo se observaron colonias a partir de la conjugación realizada con *L. biflexa*, características de leptospira, de las cuales se crecieron cinco de ellas en medio líquido EMJH-espectinomicina. Para la conjugación de *L. interrogans* se observó, luego de tres semanas, la presencia de 3 colonias, características de leptospira, las cuales también se crecieron en medio líquido EMJH-espectinomicina. De los cultivos de leptospira se realizó una extracción de ADN utilizando Maxwell y se amplificó mediante PCR una secuencia del plásmido pMaORI-OVA-GFP. De la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR se puede observar la presencia del plásmido con el inserto en las tres colonias de *L. biflexa* testeadas y en dos de las tres colonias de *L. interrogans* ensayadas. El plásmido pMAORI-OVA-GFP se utilizó como control positivo, y se colocó ADN extraído a partir de *L. biflexa* y *L. interrogans* salvajes como control, no observándose amplificación en este caso, acorde a lo esperado (**Figura 3.3.**). Para descartar posibles contaminaciones cruzadas, entre las dos especies de *Leptospira* utilizadas, se evaluó la identidad de los clones recombinantes mediante amplificación y secuenciado del 16S, confirmándose que se

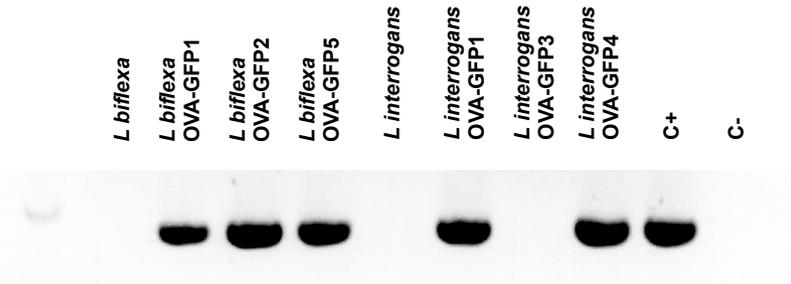


Figura 3.3. Amplificación del plásmido pMaORI-OVA-GFP en *Leptospira* spp. *L. biflexa* serovar Patoc I y *L. interrogans* serovar Manilae fueron transformadas por conjugación con el vector de expresión pMaORI-OVA-GFP. Se extrajo ADN total de cultivos de *Leptospira* transformadas, resistentes a espectinomicina, y de bacterias salvajes, y se realizó una PCR para detectar la presencia del vector. El vector pMaORI-OVA-GFP purificado fue utilizado como control positivo. Bacterias sin transformar fueron incluidas como control de la especificidad de la reacción.

trataba de *L. biflexa* y *L. Interrogans*, en cada caso.

3.4.3. Expresión de la proteína de fusión OVA-GFP en *Leptospira* spp recombinantes

A partir del cultivo de *L. biflexa* y *L. interrogans*, salvajes y conteniendo el plásmido pMaORI-OVA-GFP, se realizó un lisado de proteínas para intentar verificar por western blot la expresión de la proteína de fusión OVA-GFP. En primera instancia, se utilizaron dos anticuerpos diferentes, específicos para la proteína OVA, con los cuales no se logró determinar la expresión de la misma. Creemos que esto pudo deberse a que la secuencia presente en el plásmido codifica para péptidos pequeños de la proteína, y no la misma en su forma completa, y estos péptidos pueden no ser reconocidos por los anticuerpos utilizados con suficiente sensibilidad.

Debido a esto, realizamos un segundo western blot utilizando un anticuerpo contra la proteína GFP, ya que al tratarse de una proteína de fusión si detectamos la presencia de GFP significaría que los péptidos OVA también se expresan en estas bacterias. Como se puede observar en la **Figura**

3.4-A logramos comprobar mediante western blot la expresión de la proteína OVA-GFP en todas las leptospiros que fueron positivas por PCR para el plásmido pMaORI-OVA-GFP, mientras que la misma no se encuentra en las bacterias salvajes, de acuerdo a lo esperado. De esta manera verificamos la obtención de LBP y LIM recombinantes para péptidos OVA, que pueden ser cargados en las moléculas de MHC clase I y clase II para su reconocimiento por células T CD8+ y T CD4+ específicas, respectivamente.

La expresión de la proteína GFP de forma funcional, si bien no era un objetivo en si mismo, podía ser útil para la detección de las bacterias en diversos ensayos. Por esto, exploramos la capacidad de visualizar la misma mediante diferentes técnicas, como ser: microscopía de fluorescencia,

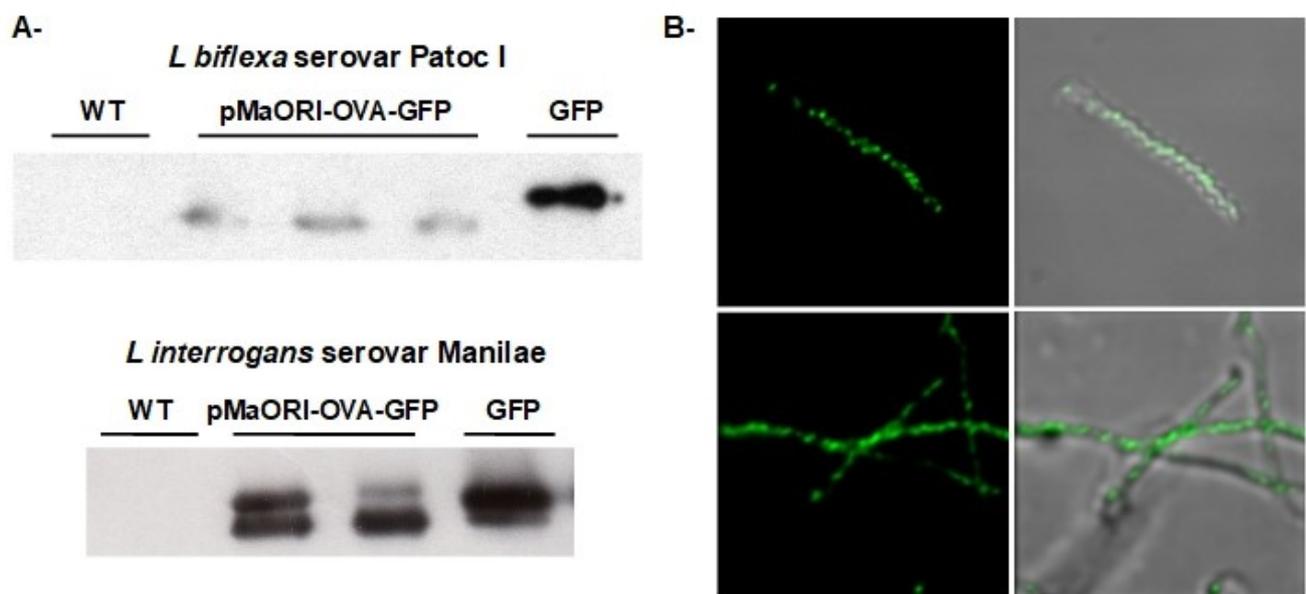


Figura 3.4. Expresión de la proteína OVA-GFP en *Leptospira spp* transformadas con el plásmido pMaORI-OVA-GFP. A- La expresión de la proteína OVA-GFP fue evaluada mediante western blot, con un anticuerpo anti-GFP, a partir del lisado de *L. biflexa* serovar Patoc I (arriba) y *L. interrogans* serovar Manilae (abajo) WT o positivas por PCR para la presencia del plásmido pMaORI-OVA-GFP. La expresión de la proteína fue confirmada en todas las bacterias transformadas, mientras que no se detectó señal para la misma en las bacterias salvajes. Proteína GFP recombinante fue utilizada como control positivo. **B-** Cultivos de *L. biflexa* serovar Patoc I (arriba) y *L. interrogans* serovar Manilae (abajo) transformadas con el plásmido pMaORI-OVA-GFP fueron visualizados por microscopía de fluorescencia confocal. En todas las cepas recombinantes se detecto señal de GFP mientras que las bacterias salvajes fueron negativas para la misma. Se muestran imágenes representativas de un clon recombinante de cada especie.

citometría de flujo e imagenología in vivo. Mediante microscopía de fluorescencia logramos distinguir las bacterias recombinantes para OVA-GFP de las salvajes, como se puede observar en la **Figura 3.4-B**. Por citometría de flujo, sin embargo, no logramos detectar la expresión de GFP, lo cual puede deberse a las dificultades, asociadas a su tamaño, de distinguir adecuadamente estas bacterias de otras partículas pequeñas.

3.4.4. Proliferación de células OT-II en respuesta a BMDCs infectadas con *Leptospira* recombinante para OVA

BMDCs de ratones *Tmem176b*^{+/+} o *Tmem176b*^{-/-} fueron incubadas con LBP o LIM, salvajes o recombinantes para OVA, a diferentes multiplicidades de infección. Transcurrido el tiempo de incubación las BMDCs se lavaron y las bacterias que pudieron quedar adheridas se eliminaron por incubación con antibiótico. Luego, las BMDCs se incubaron con células T CD4⁺, purificadas por selección positiva utilizando MACS, del bazo de ratones OT-II. En estos ratones aproximadamente un 60% de sus células son específicas para el péptido mínimo de clase II de la proteína OVA, que se expresa en nuestras leptospiras recombinantes. Luego de 3 días, se evaluó la proliferación de los linfocitos T CD4⁺, mediante citometría de flujo, por dilución de DDAO.

Encontramos una proliferación significativamente mayor de células T CD4⁺ OT-II cuando las mismas fueron incubadas con BMDCs *Tmem176b*^{+/+} infectadas con LBP-OVA comparado con BMDCs infectadas con la bacteria salvaje (**Figura 3.5-A**). Sin embargo, no se observó proliferación cuando BMDCs *Tmem176b*^{+/+} fueron infectadas con LIM-OVA, comparado con su control salvaje (**Figura 3.5-B**). De manera interesante, la proliferación observada con LBP recombinante para OVA

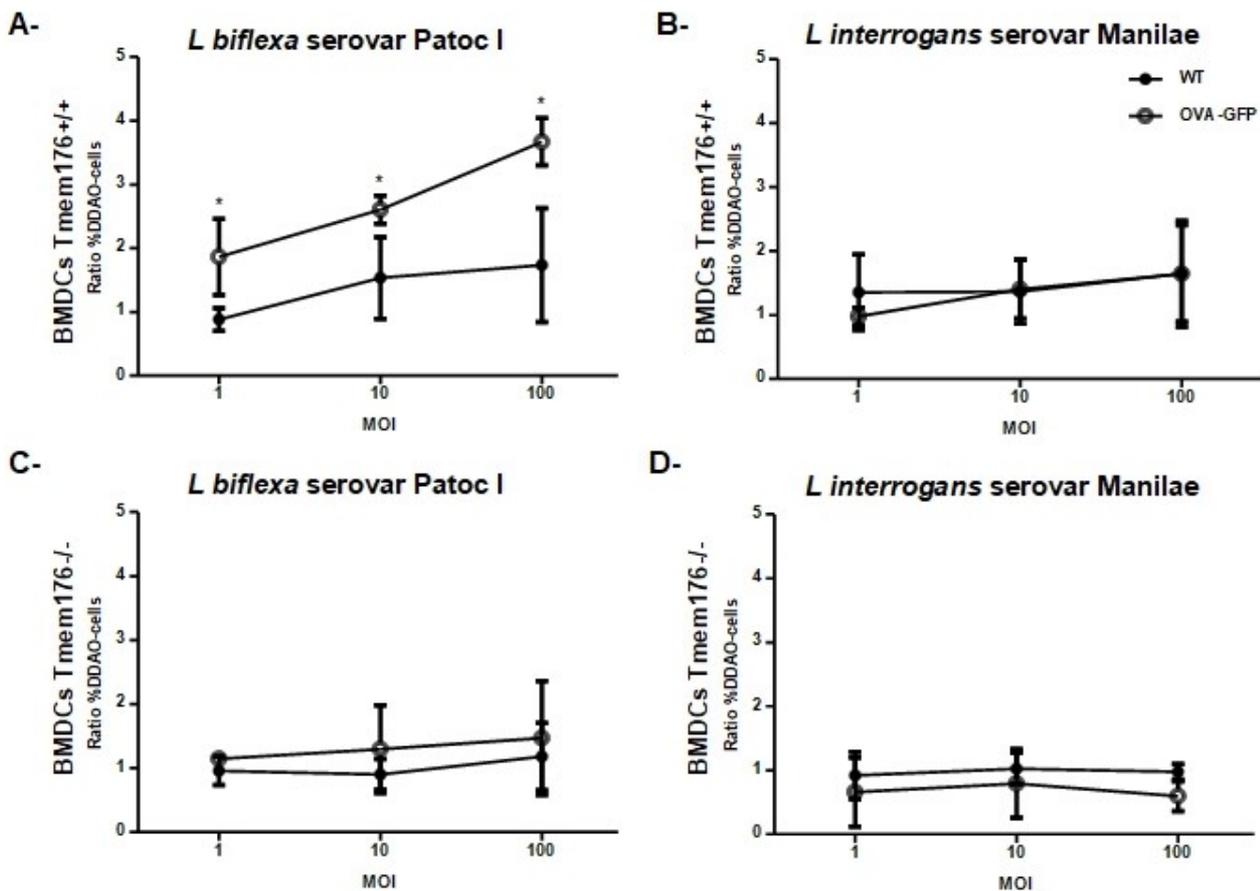


Figura 3.5. Proliferación de células OT-II en respuesta a BMDCs infectadas con *Leptospira* spp. A- BMDCs WT o Tmem176b^{-/-} fueron incubadas por 3 h con *L. biflexa* serovar Patoc recombinante para OVA (LBP-OVA) o *L. interrogans* serovar Manilae recombinante para OVA (LIM-OVA), a diferentes multiplicidades de infección (MOI). Luego las BMDCs fueron lavadas, puestas en medio con antibiótico, e incubadas con células T CD4⁺ purificadas por MACS a partir del bazo de ratones OTII, en una relación 5:1 por 3 días. La proliferación de células T CD4⁺ fue evaluada por dilución de DDAO mediante citometría de flujo. LBP y LIM WT fueron utilizadas como control de la proliferación específica para el antígeno OVA. Los resultados son mostrados como el ratio entre el porcentaje de células DDAO- en cada condición y el porcentaje de estas células en el control no infectado. Para las células Tmem176b^{+/+} se representa un pool de 4 experimentos independientes y para Tmem176b^{-/-} de 2 experimentos independientes. *p<0.05 t-test.

se pierde cuando se infectan BMDCs Tmem176b^{-/-} en lugar de células WT (**Figura 3.5-C**).

3.4.5. Producción de IFN- γ e IL-10

El IFN- γ es una citoquina sumamente importante en la respuesta frente a bacterias extracelulares,

que puede ser producida por células T CD4+ luego de su diferenciación. En el sobrenadante de cultivo de los ensayos de proliferación encontramos, mediante ELISA, una presencia significativamente mayor de IFN- γ en la condición en la cual las células OTII fueron incubadas con BMDC Tmem176b^{+/+} infectadas con LBP-OVA, comparado con las otras condiciones ensayadas (**Figura 3.6-A**). También se detectó la presencia de IFN- γ , aunque en una cantidad significativamente menor, cuando se utilizaron BMDCs Tmem176b^{-/-} infectadas con LBP-OVA. Si bien no medimos el IFN- γ producido específicamente por las células T CD4+, el mismo se detecta únicamente cuando las BMDCs son infectadas con LBP-OVA, que son las únicas capaces de inducir la proliferación de las células OT-II, al presentar el antígeno OVA, y no con las bacterias salvajes. Esto indicaría fuertemente que las células T CD4+ serían la fuente de esta citoquina, siendo coherente además con los resultados de proliferación mostrados antes.

Las diferencias en la proliferación de las células T CD4+ en respuesta a *L. biflexa* y *L. interrogans* se

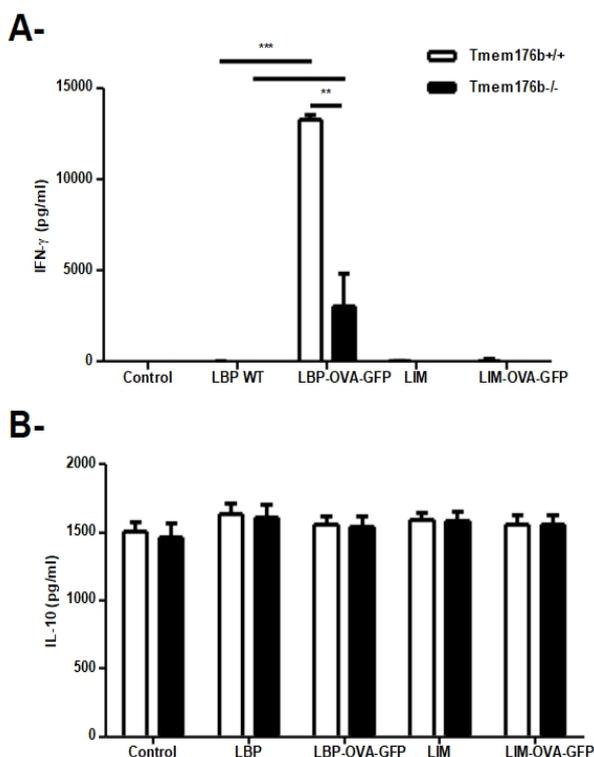


Figura 3.6. IFN γ e IL-10 en el sobrenadante de cultivo de células OT-II. A partir del sobrenadante de cultivo de los ensayos de proliferación de células OTII incubadas con BMDCs WT o Tmem176b^{-/-}, infectadas con *L. biflexa* serovar Patoc recombinante para OVA (LBP-OVA), *L. interrogans* serovar Manilae recombinante para OVA (LIM-OVA) o las cepas salvajes, a una multiplicidad de infección de 100, se evaluó mediante ELISA la presencia de **A-** IFN γ y **B-** IL-10. Se encontró una producción significativamente mayor de IFN γ en la condición con LBP-OVA y BMDCs WT comparado con el resto de las condiciones ensayadas. Para la condición de BMDCs Tmem176b^{-/-} infectadas con LBP-OVA también se detectó la presencia de IFN γ aunque en una cantidad significativamente menor que para las BMDCs WT. No se encontraron diferencias significativas en la presencia de IL-10. **p<0.01, ***p<0.001 ANOVA.

podrían explicar por la presencia de citoquinas inmunomoduladoras, que afectaran la capacidad de proliferar de las células T, *per se*, o a la capacidad de las BMDCs de inducir una respuesta de células T. Dentro de estas citoquinas se encuentra la IL-10, conocida por sus propiedades reguladoras. Mediante ELISA, medimos la presencia de IL-10 en el sobrenadante de cultivo de los ensayos de proliferación, no encontrando diferencias significativas entre las distintas condiciones (**Figura 3.6-B**). Esto indicaría que la ausencia de proliferación frente a *L. interrogans* no se podría atribuir a un efecto mediado por la IL-10, aunque restaría evaluar el papel de otras citoquinas inmunomoduladoras.

3.4.6. Maduración de BMDCs por *Leptospira* spp.

Las diferencias encontradas en la proliferación de células T CD4+ en respuesta a BMDCs infectadas con las dos especies de *Leptospira* puede deberse a varios motivos, uno de ellos es que existan diferencias en la vías de procesamiento y presentación de antígenos. Un punto clave en este proceso es el estado de maduración/activación de las células dendríticas al momento del encuentro con las células T. En este sentido, evaluamos la capacidad de *L. biflexa* y *L. interrogans* de inducir la maduración de BMDCs, medido a través de cambios fenotípicos en estas células, como ser, un aumento en la expresión de MHC de clase II y de moléculas coestimuladoras del B7 (CD80 y CD86).

Como se puede observar en la **Figura 3.7.** tanto *L. biflexa* como *L. interrogans* son capaces de inducir la maduración de BMDCs, con una expresión mayor de MHC de clase II, CD80 y CD86, comparado con la situación control. Esto parece indicar que las diferencias encontradas con

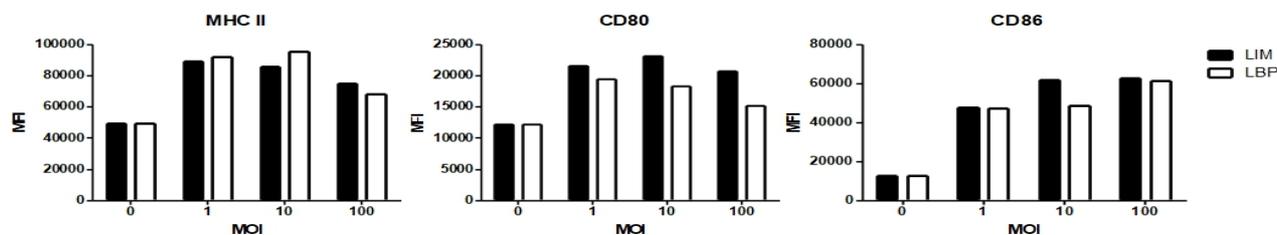


Figura 3.7. Maduración de BMDCs inducida por *Leptospira* spp. BMDCs fueron infectadas con LIM o LBP a una MOI de 1, 10 o 100. Luego de 48 hs de incubación la expresión de MCH II, CD80 y CD86 en las BMDCs se evaluó mediante citometría de flujo, y se comparó con el control sin infectar.

respecto a la respuesta de células T CD4+ frente a *L. biflexa* y *L. interrogans* no se explicaría por diferencias en la capacidad de ambas bacterias de inducir la maduración de BMDCs. Esto, tomado en conjunto con que la proliferación en respuesta a *L. biflexa* se pierde cuando utilizamos BMDCs deficientes en Tmem176b, un molécula reguladora del pH fagolisosomal, nos llevó a sospechar que la explicación podía estar a nivel del procesamiento de las bacterias para su presentación.

3.4.7. Proliferación de células OT-II en respuesta a BMDCs infectadas con *Leptospira* spp y péptido OVA

Nos propusimos evaluar si la ausencia de proliferación de células T CD4+ frente a *L. interrogans* se debía a una falla en la presentación de antígenos en general por las BMDCs expuestas a la bacteria, o era específico para antígenos bacterianos. Para esto incubamos BMDCs Tmem176b^{+/+} con *L. biflexa* o *L. interrogans* salvajes en presencia de péptido OVA de clase II. En esta situación observamos una proliferación similar de células OT-II frente a BMDCs con péptido OVA en conjunto con *L. biflexa* o con *L. Interrongans* (Figura 3.8.). De este experimento podríamos concluir que *L. interrogans* no afecta la capacidad de presentar e inducir la proliferación de células T específicas cuando el antígeno es provisto en forma de péptido, a diferencia de lo que ocurre cuando se

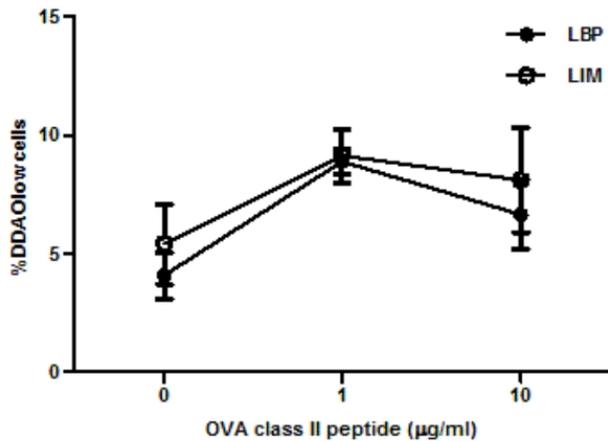


Figura 3.8. Proliferación de células OTII en respuesta a péptido OVA clase II y *Leptospira* spp. BMDCs Tmem176b^{+/+} fueron infectadas con *L. biflexa* serovar Patoc I (LBP) o *L. interrogans* serovar Manilae (LIM), a una MOI de 100, al mismo tiempo que fueron pulsadas con péptido OVA de clase II a 1 o 10 µg/mL. Luego de 3 h fueron lavadas e incubadas con células T CD4⁺ purificadas por MACS a partir del bazo de ratones transgénicos OT-II, por 3 días. La proliferación fue evaluada por dilución de DDAO mediante citometría de flujo. La condición sin péptido OVA fue tomada como la proliferación basal.

encuentra como un antígeno propio de la bacteria, y es necesario su procesamiento.

3.4.8. Medida del pH fagolisosomal de BMDCs infectadas con *Leptospira* spp

El procesamiento de antígenos para su presentación a células T CD4⁺ depende del fagolisosoma. Algunos patógenos han desarrollado mecanismos para evadir su presentación al evitar su degradación en este compartimiento, ya sea al impedir la fusión del fagosoma con el lisosoma y/o evitar su acidificación. Para explorar si *L. interrogans* sería capaz de evitar su procesamiento por esta vía, realizamos medidas de pH fagolisosomal en BMDCs Tmem176b^{+/+} y Tmem176b^{-/-}, y lo comparamos con lo que sucede con *L. biflexa*. Para esto adaptamos el protocolo descrito por Sokolovska et al. 2012. Las bacterias se cargaron con una sonda fluorescente sensible al pH como ser FITC y la sonda no sensible Alexa Fluor 647. Luego, se incubaron con BMDCs salvajes o Tmem176b^{-/-} por 30 minutos para permitir la infección. Transcurrido este tiempo, las bacterias que no fueron incorporadas se lavaron, y 2 h después de la infección inicial se realizaron las medidas de pH por citometría de flujo.

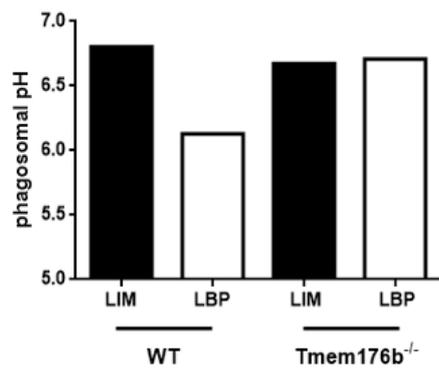


Figura 3.9. Medida de pH fagolisosomal de BMDCs infectadas con *Leptospira* spp. El pH fagosomal fue evaluado a través del método previamente descrito (Curr Protoc Immunol. 2012 Nov; Chapter 14.) Brevemente, *L. biflexa* serovar Patoc I (LBP) y *L. interrogans* serovar Manilae (LIM) fueron cargadas con las sondas fluorescentes FITC y AlexaFluor647. BMDCs WT o Tmem176b^{-/-} fueron incubadas con las bacterias fluorescentes, a una MOI de 10, por 30 minutos. Luego de 2 h la intensidad de fluorescencia fue evaluada mediante citometría de flujo. Una curva de calibración para cada especie de leptospira fue realizada a partir de BMDCs infectadas, permeabilizadas, y expuestas a medios de pH conocido. Se muestra una gráfica representativa de lo encontrado en 3 experimentos independientes.

Cuando utilizamos BMDCs salvajes, se puede observar que luego de 2 h se registra una disminución pronunciada del pH en el caso de *L. biflexa* mientras que para *L. interrogans* el pH continúa cercano a la neutralidad (**Figura 3.9.**). En el caso de las BMDCs Tmem176b^{-/-} el pH se presenta más alcalino que el de las BMDCs salvajes, como ya había sido reportado previamente (Segovia et al. 2014). De manera interesante, en las células deficientes en Tmem176b, el pH se mantiene alcalino con ambas bacterias, perdiéndose la acidificación encontrada para *L. biflexa* con las células salvajes (**Figura 3.9.**).

Estos resultados indicarían que *L. interrogans* es capaz de evitar su exposición a un ambiente ácido dentro de las BMDCs, lo que provocaría que sus antígenos no sean procesados correctamente para su presentación a células T CD4⁺ y explicaría la falta de respuesta de células OT-II encontrada antes. Por otra parte, *L. biflexa* si se expondría a un ambiente ácido, pudiendo ser degradada, lo que es coherente con que las células OT-II proliferen en respuesta a BMDCs salvajes infectadas con esta bacteria. Sin embargo, en concordancia con lo que habíamos observado antes, cuando utilizamos BMDCs Tmem176b^{-/-} hay una falla en la acidificación que repercute en una pérdida de

proliferación de células T CD4+ frente a *L. Biflexa*.

3.4.9. Infección de ratones con *L. interrogans* y depleción de células T CD4+

Para evaluar la relevancia biológica de la presencia de células T CD4+ específicas contra *L. interrogans* en la respuesta inmune frente a la bacteria, realizamos ensayos de infección en ratones a los cuales depletamos o no de linfocitos T CD4+. Los resultados de inmunohistoquímica contra *L. interrogans* mostraron un inmunomarcado positivo en los ratones infectados, con y sin depleción de células T CD4+, mientras que los ratones del grupo control fueron todos negativos para la presencia de la bacteria, por esta técnica. De esta manera se verificó la presencia de *L. interrogans* en riñón a los 15 días post infección en los animales inoculados. Además se realizó un inóculo de riñón de los animales control e infectados en medio EMJH, constatándose el crecimiento de *Leptospira* únicamente en el último caso, verificando de esta manera la presencia

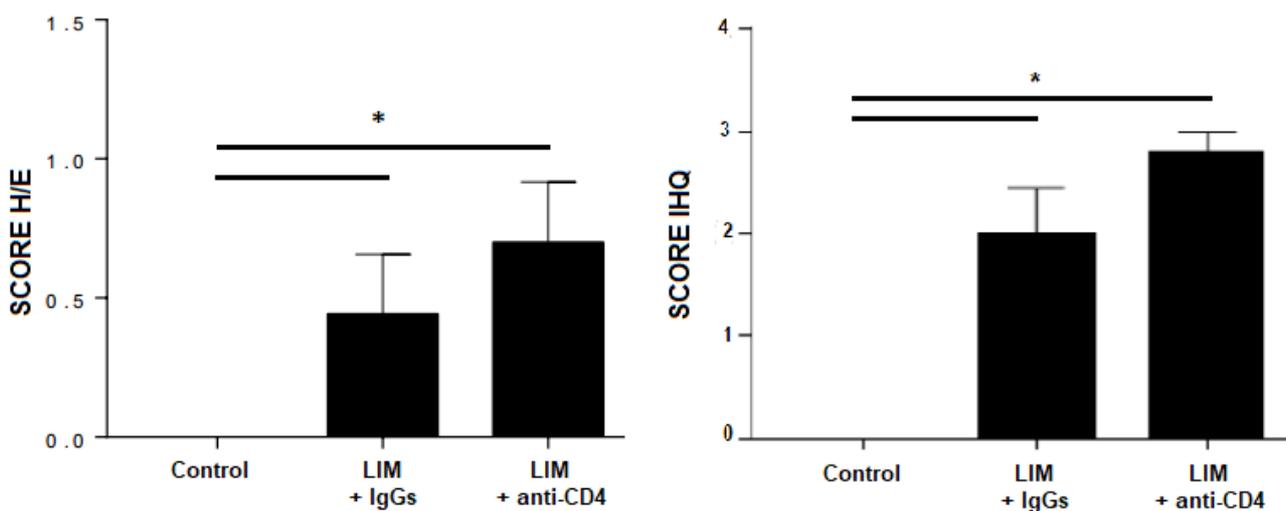


Figura 3.10. Infección con *L. Interrogans* serovar Manilae y depleción de células T CD4+. Hembras C57B6 de 8-10 semanas fueron infectadas por vía intraperitoneal con un único inóculo de 1×10^7 bacterias LIM en PBS. La depleción de células T CD4+ se realizó mediante la administración i.p. de un anticuerpo anti-CD4 comenzando un día antes de la infección y repitiendo cada 3 días. El análisis histológico se realizó como se describe en materiales y métodos por la Plataforma de Salud Animal, INIA La estanzuela. * $p < 0.05$ análisis de Dwass, Steel, Critchlow-Flinger. 5 animales por grupo.

de bacterias viables en el riñón de los animales infectados. No se encontraron diferencias significativas en el score de inmunomarcado entre los grupos de ratones infectados depletados de linfocitos T CD4+ e infectados sin depletar (**Figura 3.10.**).

En lo que refiere a la presencia y grado de lesiones en riñón, se encontraron diferencias significativas entre los animales control e infectados, pero no entre los depletados de células T CD4+ y los sin depletar. Sin embargo, se puede observar una tendencia a un score para lesiones mayor en el grupo de ratones infectados a los cuales se les depletó de células T CD4+ comparado con los infectados control (**Figura 3.10.**). Se registró una co-localización entre el inmunomarcado para *Leptospira* y la presencia de lesiones.

3.4.10. Infección de ratones WT y Tmem176b^{-/-} con *L. interrogans*

En este punto nos propusimos determinar si Tmem176b podría ser una molécula relevante en la respuesta contra *L. interrogans*. Su papel como regulador del pH fagolisosomal y la importancia del procesamiento de la bacteria por esta vía, para la generación de una respuesta inmune adaptativa contra ella, mostrada anteriormente, nos llevó a evaluar el curso de la infección en ratones Tmem176b^{-/-}, comparado con animales salvajes. Los resultados de inmunohistoquímica confirmaron la presencia de la bacteria en los grupos de animales WT y Tmem176b^{-/-} infectados, siendo negativa para los grupos control sin infectar. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el score de inmunohistoquímica entre los animales infectados salvajes y deficientes en Tmem176b (**Figura 3.11.**).

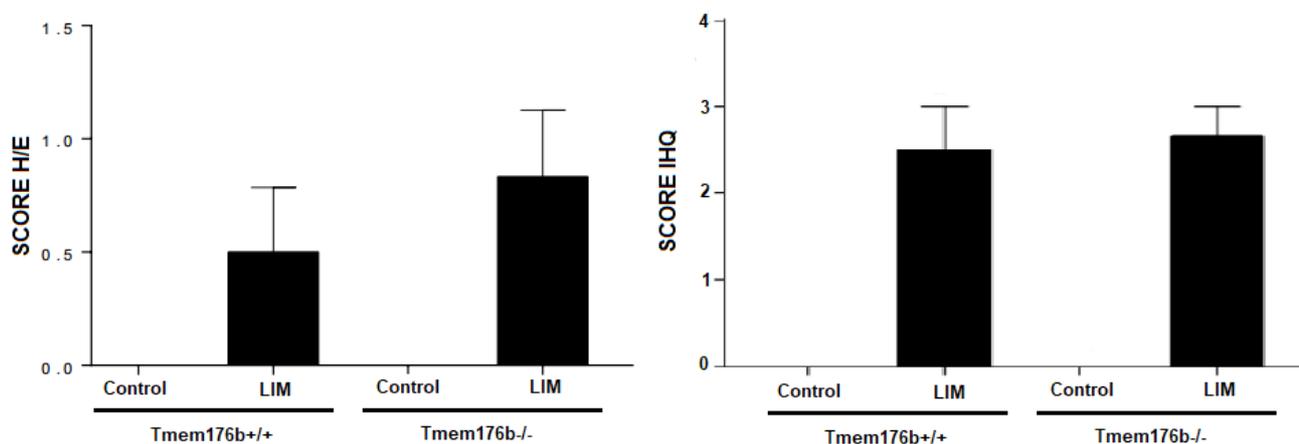


Figura 3.11. Infección con *L. Interrogans* serovar *Manilae* en ratones WT y *Tmem176b* KO . Hembras C57B6 de 8-10 semanas *Tmem176b*^{-/-}, o su control WT, fueron infectadas por vía intraperitoneal con un único inóculo de 1×10^7 bacterias LIM en PBS. Los animales se sacrificaron 15 días post infección. El análisis histológico se realizó como se describe en materiales y métodos por la Plataforma de Salud Animal, INIA La estanzuela. Se contó con 2 animales en los grupos WT y 3 en los grupos KO.

Para el score de H/E, que evalúa la presencia y grado de lesiones, tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, aunque si una clara tendencia a un score mayor en los riñones de los animales *Tmem176b*^{-/-} comparado con los animales WT (**Figura 3.11**). No se registraron lesiones en ninguno de los grupos de animales no infectados, de acuerdo a lo esperado. Cabe destacar que se constató la muerte de un animal del grupo KO 3 días luego de la infección. Se realizaron además marcados para detectar la presencia de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para OVA en ratones *Tmem176b*^{-/-} o WT infectados con *L. interrogans* recombinante para OVA.

3.4.11. Producción de IL-1 β por BMDCs en respuesta a *Leptospira* spp

Si bien el incremento de lesiones por *Leptospira* en los animales deficientes en *Tmem176b* podría ser atribuible a una respuesta de células T CD4⁺ disminuida en este grupo, no debemos olvidar el

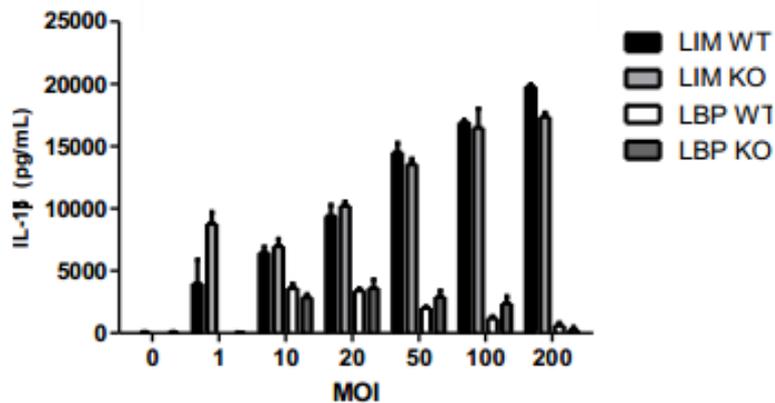


Figura 3.12. Producción de IL-1 β por BMDCs infectadas con *Leptospira* spp. BMDCs WT o deficientes en Tmem176b (KO) fueron incubadas con LIM o LBP a diferentes MOI. Transcurridas 48 hs de cultivo se midió, mediante ELISA, la presencia de IL-1 β en el sobrenadante de cultivo. BMDCs sin infectar fueron utilizadas como control.

papel de esta molécula como reguladora del inflamasoma Nlrp3. En este sentido, existen algunos trabajos que evalúan la activación del inflamasoma en respuesta a la bacteria en macrófagos, pero no hay literatura disponible que lo haga en células dendríticas. En este trabajo, evaluamos la producción de IL-1 β por BMDCs WT o deficientes en Tmem176b en respuesta a *L. biflexa* y *L. interrogans*.

Detectamos una presencia mayor de IL-1 β en el sobrenadante de cultivo de BMDCs infectadas con *L. interrogans* comparado con *L. Biflexa* (Figura 3.12). A su vez, de acuerdo a lo esperado, se registró una producción mayor de esta citoquina frente a *L. interrogans* por BMDCs Tmem176b^{-/-} comparado con células WT (Figura 3.12). Las diferencias se observan a MOIs bajas, lo que puede deberse a que luego haya una saturación del sistema. En esta dirección creemos, que de suceder *in vivo*, la producción incrementada de esta potente citoquina proinflamatoria por BMDCs deficientes en Tmem176b frente a *L. interrogans* podría explicar, al menos parcialmente, el aumento de lesiones renales encontrada en los animales Tmem176b^{-/-}.

3.5. DISCUSIÓN

Leptospira puede causar dos manifestaciones clínicas distintas de la enfermedad, dependiendo del hospedero mamífero y del serovar infectante, yendo desde una infección crónica asintomática a una enfermedad aguda grave. El desarrollo de una u otra depende de factores poco comprendidos, siendo la interacción entre el sistema inmunitario del hospedero y la cepa de la bacteria críticos en determinar el resultado final de la infección. Los mecanismos responsables de la patogénesis de *Leptospira* no están del todo elucidados. Si bien se considera que para el desarrollo de la infección son importantes tanto elementos del patógeno como del hospedero, la ausencia, durante muchos años, de mecanismos de manipulación genética de esta bacteria ha retrasado la identificación precisa de factores de virulencia.

El reciente desarrollo de herramientas genéticas ha facilitado la construcción de mutantes definidos de *Leptospira*, lo que ha permitido identificar factores de virulencia y comprender mejor la biología de estas bacterias. Se puede introducir ADN a *Leptospira* mediante electroporación o por conjugación con *E. coli*, utilizando vectores de transporte (Picardeau 2015). En el año 2015 se describió la construcción del plásmido pMaORI, el primer vector replicativo y estable en especies patógenas de *Leptospira* (Pappas et al. 2015). Aprovechando la disponibilidad de esta herramienta, clonamos dentro del vector pMaORI la secuencia codificante para una proteína de fusión conteniendo dos péptidos OVA y la proteína fluorescente GFP. El vector contiene la secuencia de los péptidos OVA y GFP en una única copia, bajo el promotor de la proteína FlgB, de expresión constitutiva en *Leptospira*, pretendiendo lograr, de esta manera, la expresión basal de nuestra proteína en la bacteria.

La secuencia OVA-GFP fue testeada para el uso de codones por *Leptospira*, encontrándose algunos codones extraños, lo que, en principio, podía dificultar la expresión de la proteína. Por esto, se diseñó, como plan alternativo, una secuencia nueva con codones optimizados para su expresión en *Leptospira*, conteniendo un repetido en tándem de tres secuencias codificantes para los péptidos OVA y un tag FLAG. La secuencia inicial funcionó correctamente por lo que no fue necesario utilizar la alternativa, pero disponemos de la misma en caso de que busquemos mejorar la expresión de los epítopes OVA.

Mediante transformación, por conjugación con *E. coli*, logramos generar *Leptospiras* transgénicas para los péptidos OVA. Se generó una especie patógena, *L. Interrogans* serovar Manilae, y una saprófita, *L. Biflexa* serovar Patoc I, recombinantes para OVA, lo que nos permitió comparar la respuesta inmune inducida por cada una de ellas, tratando de encontrar elementos que expliquen el por qué de la patogenicidad de *L. interrogans*. En una primera instancia se intentó corroborar la expresión de la proteína mediante la realización de un western blot utilizando anticuerpos contra la proteína OVA. Este primer abordaje no fue exitoso, creemos que debido a que la secuencia de OVA presente en el plásmido no codifica para la proteína completa sino para dos péptidos pequeños de la misma, que pueden no ser reconocidos por los anticuerpos con suficiente sensibilidad. Finalmente, la expresión de la proteína de fusión se evidenció mediante un western blot anti-GFP, a partir del lisado de las bacterias recombinantes, utilizando bacterias sin transformar como control.

Las bacterias expresan dos péptidos OVA, uno puede ser cargado en el MHC de clase I, y por tanto ser reconocido por células T CD4+ específicas, y el otro puede ser cargado en el MHC de clase II,

siendo reconocido por células T CD8+ específicas. En este modelo, los péptidos OVA se expresan dentro de una proteína de fusión, como si fueran antígenos de la bacteria. La utilización de este antígeno modelo facilita el estudio de la respuesta inmune de células T específicas contra la bacteria. Si bien se podría evaluar la respuesta de células T contra cualquier antígeno bacteriano, la proporción de células presentes en un animal normal capaces de reconocer un antígeno peptídico particular es muy baja. Trabajar con porcentajes tan bajos, dificulta encontrar diferencias, por lo que el uso de patógenos recombinantes para epítopes OVA se ha vuelto una estrategia experimental interesante. Para esto, actualmente se dispone de la cepas de ratones transgénicos OT-I y OT-II. En los ratones OT-I sus células T CD8+ portan TCRs específicos para el péptido OVA de clase I, mientras que en los OT-II sus células T CD4+ portan TCRs específicos para el péptido OVA de clase II. Esto ha permitido estudiar, de una manera más precisa, la respuesta de células T, tanto *in vitro* como *in vivo*, a distintos patógenos, por ejemplo influenza, así como en modelos tumorales y de trasplante (Garulli et al. 2011).

Como mencionamos en la introducción de este capítulo, tanto las células B como las T tienen un papel importante en la generación de una respuesta inmune protectora frente a la infección por *Leptospira*. Sin embargo, la respuesta de células T ha sido significativamente menos explorada. En este trabajo nos propusimos estudiar la respuesta de células T CD4+ frente a células dendríticas derivadas de médula ósea murinas infectadas con una especie de *Leptospira* patógena y una saprófita. Observamos una proliferación significativa de células T CD4+ provenientes de ratones OT-II, con producción de IFN- γ , en respuesta a BMDCs infectadas con *L. biflexa* recombinante para los péptidos OVA. Esta proliferación no la observamos cuando utilizamos la bacteria salvaje, por lo que podemos concluir que se trata de una respuesta específica al péptido OVA. En este mismo

experimento no observamos proliferación de células T CD4+ OT-II frente a BMDCs infectadas con *L. interrogans* recombinantes, una especie patógena de *Leptospira*.

Si bien se corroboró la expresión de la proteína de fusión en las dos especies de *Leptospira*, no podemos saber si los péptidos OVA se expresan en la misma proporción en ambas. Para descartar que la falta de respuesta se debiera a una expresión menor del antígeno en la especie patógena, incluimos una MOI de 200 para esta última, no observándose tampoco proliferación. Además, las imágenes de microscopía mostraron una señal de GFP similar en ambas especies recombinantes, por lo que, en principio, se podría descartar que las diferencias se deban a una expresión diferencial del antígeno en ambas especies.

Además de evaluar la tasa de proliferación, medimos algunas citoquinas relevantes en el sobrenadante de cultivo de los ensayos de proliferación. El resultado más interesante lo obtuvimos para el IFN- γ , encontrando que la proliferación observada para *L. biflexa* recombinante se acompañaba de una producción significativa de esta citoquina. Si bien no podemos asegurar que la fuente de dicha citoquina fueran las células T CD4+ la misma se encuentra únicamente en la condición en la cual utilizamos la leptospira OVA, capaz de inducir la respuesta de las células T CD4+ transgénicas. Si se tratara de un efecto sobre la células dendrítica esperaríamos observar la presencia de la misma tanto con las leptospiros recombinantes como con las salvajes. El IFN- γ es producido principalmente por células T CD4+ diferenciadas a un perfil Th1, siendo *a priori* esta la respuesta celular más efectiva para eliminar este tipo de patógenos. De hecho, las células T productoras de IFN- γ parecen ser la principales responsables de la eliminación de leptospira en riñón en un modelo de ratón (Chassin et al. 2009).

Otra citoquina que nos pareció interesante estudiar, dada la falta de respuesta encontrada para *L. interrogans*, fue la IL-10. Como se mencionó en la introducción, la IL-10 es una potente citoquina inmunoreguladora que puede ser producida por células dendríticas tolerogénicas, en respuesta a distintos estímulos, llevando a una respuesta de tipo reguladora en lugar de una respuesta efectora. En este caso, no encontramos diferencias significativas en la presencia de IL-10 en el sobrenadante de cultivo de las distintas condiciones ensayadas. Si bien restaría evaluar la presencia en el sobrenadante de otras citoquinas reguladoras, como el TGF- β , ensayos realizados por RT-PCR, en BMDCs infectadas con LBP y LIM, no mostraron diferencias significativas en la expresión de TGF- β frente a la infección por una u otra bacteria (**Figura S4.5.**). Tomado en conjunto, esto parece descartar un papel, al menos protagónico, de las citoquinas inmunoreguladoras, en este contexto.

La falta de respuesta de células T CD4+ frente a *L. interrogans*, a diferencia de lo observado con *L. biflexa*, nos llevó a preguntarnos si la bacteria patógena no dispondría de algún mecanismo de evasión que le permitiera evitar su procesamiento y/o presentación a las células T. En este punto, es clave la interacción del patógeno con la célula dendrítica. En la bibliografía se encuentra un único trabajo que aborda la interacción célula dendrítica-leptospira (Gaudart et al. 2008). En este trabajo encontraron que carbohidratos de *Leptospira* ricos en manosa pueden ser reconocidos por el receptor DC-SIGN de células dendríticas humanas derivadas de monocitos (MoDC), mediando esta interacción la adherencia a la célula (Gaudart et al. 2008). Este reconocimiento, a su vez, llevaría a la maduración de las MoDCs, con un aumento en la expresión de CD83 y CD86 (Gaudart et al. 2008). En línea con esto, nosotros encontramos que *L. biflexa* y *L. interrogans* serovar

Manilae, son capaces de inducir la maduración de BMDCs, en este caso murinas, con un aumento en la expresión de CD80, CD86 y MHC de clase II, sin diferencias significativas entre ambas especies. Esto parece indicar que las diferencias encontradas con respecto a la respuesta de células T CD4+ no se explicaría por diferencias en la capacidad de las dos especies de *Leptospira* de inducir la maduración de BMDCs.

En el trabajo de Gaudart et al. encontraron, además, que si bien la maduración fue igual frente a *L. interrogans* de distintos serovares (Autumnalis L-643, Autumnalis BL-6 y Pyrogenes, virulenta y avirulenta), la producción de citoquinas, como TNF- α , IL-12p70 e IL-10, presentó algunas diferencias (Gaudart et al. 2008). De acuerdo a lo esperado, dado que se trata de dos especies distintas de *Leptospira*, nosotros encontramos, también, diferencias en la producción de citoquinas por BMDCs frente a *L. biflexa* y *L. interrogans*, medidas por RT-PCR (**Figura S4.5**). Resta, sin embargo, repetir estos ensayos y realizar un análisis profundo para poder sacar conclusiones al respecto.

Para determinar si *L. interrogans* cuenta con algún mecanismo que evite la proliferación de células T CD4+ en general, por ejemplo al inducir la expresión de moléculas inhibitoras en la DC, o al evitar el cargado de péptidos en moléculas de MHC de clase II, o si, por el contrario, lo que está impedido es el procesamiento de antígenos, se realizaron ensayos de proliferación en presencia de *L. interrogans* salvajes y péptido OVA. En esta situación observamos una proliferación similar de células OT-II frente a BMDCs con péptido OVA en conjunto con *L. biflexa* o con *L. interrongans*. Esto indicaría que la proliferación se ve afectada cuando el antígeno OVA se presenta como parte de la bacteria y es necesario su procesamiento, pero no si es provisto en forma de péptido, sugiriendo

que las diferencias se encontrarían a nivel del procesamiento de antígenos. Coherente con esto, cuando evaluamos la proliferación de células T CD4+ OT-II frente a BMDCs infectadas con *L. biflexa* deficientes en Tmem176b, un regulador del pH fagolisosomal, se pierde la respuesta observada para la bacteria con BMDC WT.

Varios trabajos realizados en macrófagos sugieren que la internalización de la bacteria depende de la presencia de anticuerpos específicos, siendo mínima, o incluso inexistente, en ausencia de estos. Es por ello que, antes de adentrarnos a estudiar el procesamiento de la bacteria, verificamos que efectivamente las BMDCs son capaces de incorporar ambas especies de *Leptospira*, ya que la falta de proliferación podía deberse, simplemente, a que *L. interrogans* no pudiera ser internalizada por estas células. Nuestros ensayos de fagocitosis mostraron que ambas especies pueden ser incorporadas por las células dendríticas murinas (**Figura S4.6.**). En este sentido, un estudio con *L. interrogans* serovar Manilae, en macrófagos murinos derivados de médula ósea, demostró que esta bacteria era capaz de sobrevivir y replicar dentro de compartimentos en esas células, y ser liberada al espacio extracelular (Toma et al. 2011). Otro estudio, realizado en una línea celular de macrófagos murinos, mostró que *L. interrogans* serovar Lai se localiza dentro de los fagolisomas de estas células de manera transitoria y luego es eliminada (Li et al. 2010). En el mismo trabajo vieron que en macrófagos humanos la bacteria también replicaba, pero en el citosol de las células, y luego inducía la apoptosis celular, con la consecuente liberación de las bacterias al medio extracelular. En relación con esto, si bien no lo evaluamos específicamente, *L. interrogans* serovar Manilae no parece inducir la muerte de las células dendríticas de ratón utilizadas en nuestros ensayos.

Como mencionamos antes, algunos trabajos han sugerido que especies virulentas de *Leptospira* pueden evitar la fusión de fagosomas conteniendo bacterias con lisosomas en macrófagos, evitando de esta manera su destrucción (Toma et al. 2011). No existe evidencia de que lo mismo ocurra en células dendríticas. Pero, la degradación de antígenos a péptidos por la vía fagolisosomal es fundamental para la presentación a células T CD4+, siendo la acidificación del compartimiento fagolisosomal un evento clave. En este sentido, evaluamos el pH fagolisosomal de BMDCs WT y deficientes en *Tmem176b*, infectadas con *L. biflexa* o *L. interrogans*. Observamos una disminución marcada del pH para *L. biflexa*, mientras que el mismo se mantuvo cercano a la neutralidad en el caso de *L. interrogans*, cuando utilizamos BMDCs WT. No podemos saber si esto se debe a que *L. interrogans* es capaz de impedir la fusión del fagosoma con el lisosoma, o si lo que hace es evitar la acidificación de este compartimiento, ya que no contamos con imágenes de microscopía que evidencien, o no, la co-localización de la bacteria con marcadores lisosomales.

Cuando se utilizaron BMDCs deficientes en *Tmem176b*, no se observó acidificación con ninguna de las bacterias, siendo esto coherente con los resultados de proliferación. Esto sugiere, además, que *Tmem176b* podría ser una molécula relevante para el curso de la infección por *Leptospira*. En base a estos resultados se realizaron experimentos de manera de evaluar la relevancia *in vivo* de las células T CD4+ y de *Tmem176b*, en un modelo de ratón. Durante muchos años se ha cuestionado la utilización del ratón como modelo animal para la infección por *Leptospira*. De hecho los ratones son bastantes resistentes a la infección aguda por *Leptospira*, por lo que no son un buen modelo para estudiar este tipo de enfermedad. Sin embargo, como mencionamos antes, la leptospirosis incluye un amplio espectro de manifestaciones clínicas, y los ratones pueden ser un buen modelo si lo que queremos es evaluar la infección renal crónica por esta bacteria. Este modelo presenta,

además, como clara ventaja que se dispone de un amplio panel de reactivos para evaluar la respuesta inmune en estos animales.

Para evaluar la relevancia de las células T CD4+, se infectaron ratones con *L. interrogans* serovar Manilae y se depletó a los animales de este tipo celular, utilizando un anticuerpo específico. Los resultados de histología e inmunohistoquímica de riñón de los animales infectados no mostraron diferencias significativas entre el grupo depletado de células T CD4+ y el control sin depletar, aunque se observa una tendencia a un daño tisular mayor en el primero. Previamente, ya se había evaluado la relevancia de las células T en un modelo de infección aguda por *Leptospira* en ratones deficientes en CD3 (Chassin et al. 2009). En este trabajo concluyeron que las células T no eran relevantes, ya que a diferencia de lo que ocurría frente a la ausencia de células B, los ratones no se volvían susceptibles a la infección aguda por *Leptospira* (Chassin et al. 2009). Sin embargo, en ese mismo estudio, la evidencia histológica de daño en el tejido renal mostró ser mayor en animales CD3^{-/-} que carecen de células T funcionales, en comparación con ratones WT o μ MT (deficientes en células B). El examen histológico de los riñones infectados mostró evidencia de inflamación intersticial y desarrollo de infiltrados nodulares en ratones con deficiencia de células T que estaban ausentes en los riñones de ratones con deficiencia de células B o WT infectados (Chassin et al. 2009). Finalmente, los marcadores serológicos de daño renal estaban elevados en ratones con deficiencia de células T infectados, pero no en ratones con deficiencia de células B o WT (Chassin et al. 2009). Combinados, estos datos proporcionan un argumento convincente de que la respuesta Th1, o CMI, que involucra a las células T es un componente importante de la respuesta inmune en lo que se relaciona con la infección por *Leptospira*. Nos resta repetir este experimento para intentar obtener resultados convincentes en este sentido.

En lo que respecta a la función de Tmem176b en la infección por *Leptospira*, observamos una tendencia a un score mayor de daño tisular en el riñón de ratones infectados con *L. Interrogans*, deficientes en esta proteína. Esto podría explicarse principalmente de dos maneras. Una es que los ratones Tmem176b^{-/-} presenten una respuesta de células T CD4⁺ específicas contra *Leptospira* disminuida, comparado con los animales WT. Esto iría en línea con los resultados obtenidos *in vitro*, donde las células presentadoras de antígeno de animales deficiente en Tmem176b mostraron un impedimento en la acidificación fagolisosomal. Coherente con esto, un resultado preliminar, en el que evaluamos mediante tetrámeros la presencia de células T CD4⁺ específicas de OVA, en animales Tmem176b^{-/-} o WT infectados con *L. interrogans* serovar Manilae recombinantes para OVA, indicaría un número menor de células T CD4⁺ específicas en los animales deficientes en Tmem176b comparado con los animales control.

Otra explicación al incremento en el daño tisular observado en los ratones Tmem176b^{-/-} se relaciona con su función como proteína reguladora del inflamasoma. Varias líneas de evidencia sugieren que la activación robusta de los inflasomas puede contribuir al daño tisular debido a la infección por *Leptospira*, particularmente en pulmón y riñón. Los dos factores desencadenantes necesarios para obtener un alto nivel de activación de los inflasomas (LPS y salida de potasio), que dan como resultado una producción robusta de IL-1 β , están presentes durante la leptospirosis aguda (Mariathasan & Monack 2007). El LPS es un componente de la membrana externa de la bacteria y el eflujo de potasio es inducido por una glicolipoproteína leptospiral (Lacroix-Lamande et al. 2012). De acuerdo con esta hipótesis, se han presentado evidencias de una sobreexpresión masiva de citoquinas proinflamatorias en hámsters que experimentan leptospirosis grave (Matsui

et al. 2011). Otros estudios también han encontrado niveles altos de citoquinas inflamatorias asociados con la infección letal en estos animales (Marinho et al. 2009; Vernel-Pauillac & Goarant 2010). Además, los pacientes que sufren de leptospirosis aguda también presentan evidencias de sobreexpresión de citoquinas inflamatorias, y se ha indicado al ST2 soluble y la pentraxina larga PTX3 como posibles marcadores para la infección aguda (Wagenaar et al. 2009).

En este trabajo, evaluamos la producción de IL-1 β por BMDCs WT o deficientes en *Tmem176b* en respuesta a *L. biflexa* y *L. interrogans*, detectando una presencia mayor de IL-1 β en el sobrenadante de cultivo de BMDCs infectadas con *L. interrogans* comparado con *L. biflexa* y, a su vez, una producción mayor de esta citoquina frente a *L. interrogans* por BMDCs *Tmem176b*^{-/-}, comparado con células WT, a bajas MOI. Esto apoyaría un papel de *Tmem176b* como proteína capaz de regular la activación del inflamasoma *Nlrp3* en respuesta a *L. interrogans*, lo que, tomado en conjunto con los resultados obtenidos en los animales *Tmem176b*^{-/-}, sugiere un papel importante de la misma en el curso de la infección.

En un trabajo publicado este año se demostró por co-inmunoprecipitación la interacción de *TMEM176A* con la proteína *EspF* de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 (Hua et al. 2018). EHEC es un patógeno presente en los alimentos que ha desarrollado varias vías de evasión de la respuesta inmune. La proteína *EspF* es un factor de virulencia importante de esta bacteria, para la cual se postula un papel dual, promoviendo por un lado la respuesta inflamatoria en las células del hospedero, y por otro evitando la fagocitosis, y/o etapas posteriores de procesamiento, por parte de los macrófagos (Hua et al. 2018). *EspF* es un factor de virulencia presente también en bacterias del género *Mycobacterium* (Bottai et al. 2011). Si bien en el trabajo de Hua et al. (2018)

no muestran la relevancia fisiológica de la interacción entre EspF y TMEM176A es una primera evidencia de que proteínas bacterianas asociadas a virulencia e inmunoevasión podrían interactuar físicamente con TMEM176A y/o B.

Dado el papel de las proteínas TMEM176 en el procesamiento y presentación de antígenos por células dendríticas y en la regulación de la respuesta inflamatoria, la acción de factores de virulencia sobre las mismas aparece como una forma de modular ambos procesos al mismo tiempo. Un BLAST de la proteína EspF de EHEC no mostró posibles homólogos de la misma en *L. interrogans*. Sin embargo, dado que los factores de virulencia asociados a la infección por *Leptospira* no están del todo elucidados, no se podría descartar que proteínas de esta bacteria pudieran interactuar con Tmem176 y regular su función, como mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

CONCLUSIONES GENERALES

En esta maestría nos propusimos aportar conocimientos que contribuyan a la caracterización de los canales iónicos Tmem176a y Tmem176b, como moléculas inmunorreguladoras. Para esto trabajamos en un modelo infeccioso, con el patógeno *Leptospira*, y en la leucemia linfocítica crónica, una de las oncologías hematológicas más comunes en adultos en nuestro país.

En la LLC demostramos que la expresión de TMEM176A por células leucémicas se asocia a la progresión de la enfermedad. En linfocitos B leucémicos, TMEM176A inhibe la activación de caspasa-1, evitando la muerte piroptótica. La disminución en la expresión o inhibición farmacológica de TMEM176A en estas células induce su piroptosis, de una manera dependiente de caspasa 1. La asociación del inhibidor de TMEM176A a un fármaco descrito como activador de la apoptosis y de uso común en la clínica de la LLC, como es el venetoclax, induce la muerte de las células tumorales en niveles superiores a los obtenidos con la monoterapia. En este modelo mostramos como TMEM176A regula la activación de caspasa-1 y la piroptosis en células tumorales, siendo un posible blanco terapéutico en este tipo de leucemias.

Con respecto a la infección por *Leptospira*, observamos que la infección de DCs con *L. biflexa* induce la activación de linfocitos T CD4+ específicos de la bacteria, mientras que esto no sucede con *L. interrogans*. Dicha capacidad de estimular los linfocitos T se pierde si se utilizan DCs Tmem176b^{-/-}. El pH fagosomal observado en DCs WT infectadas con las bacterias se acidifica a los pocos minutos luego de la infección. En contraste, el pH fagosomal de DCs Tmem176b^{-/-} infectadas no logra acidificarse. La infección de DCs WT con *L. interrogans* inhibe la acidificación fagosomal y la presentación de antígenos a las células T. Estos resultados sugieren que la bacteria inhibe la

activación de una respuesta inmune adaptativa mediada por células T CD4+ a través de la manipulación del pH fagosomal. Estudios preliminares *in vivo*, en un modelo de infección crónica de ratones por *L. interrogans*, sugieren que la deficiencia genética de Tmem176b se asocia a un daño tisular mayor en los riñones, lo que se podría explicar por una respuesta de células T CD4+ disminuida y/o un aumento de la respuesta inflamatoria. En este modelo mostramos nuevos indicios de Tmem176b como regulador clave, no solo la respuesta inflamatoria, sino también del procesamiento y presentación de antígenos, con consecuencias para la subsecuente respuesta inmune adaptativa.

CAPÍTULO IV: FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS

S4.1. Expresión de TMEM176B en PBMCs de pacientes con LLC

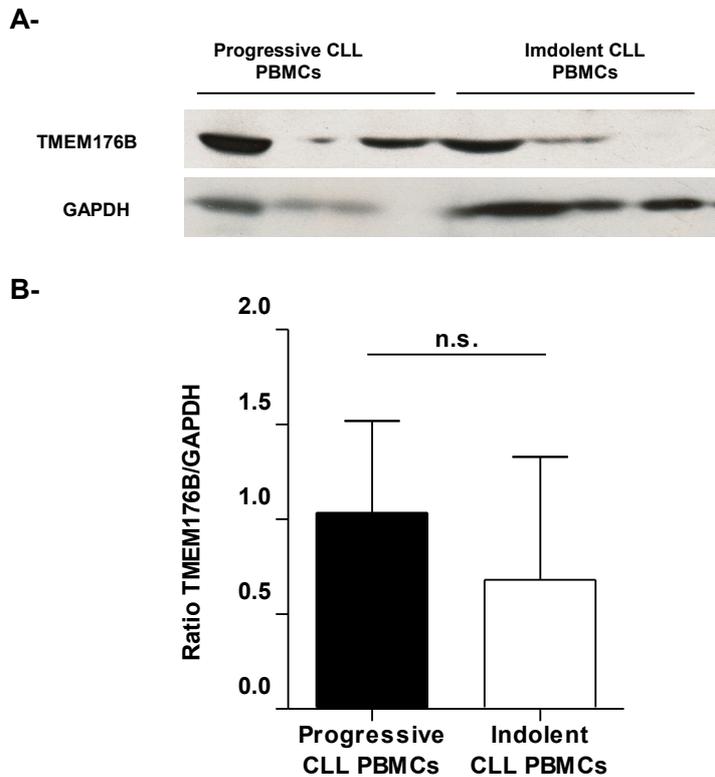


Figura S4.1. Expresión de TMEM176B en PBMCs de LLC. **A-** Se realizó un Western Blot para detectar la presencia de TMEM176B en lisados celulares de PBMC aisladas de individuos con LLC. De acuerdo con los datos clínicos los individuos fueron clasificados como indolentes o progresores para la enfermedad. La figura es representativa de lo encontrado al analizar 14 muestras (7 de pacientes clasificados como indolentes y 7 de progresores). La proteína de expresión constitutiva GAPDH fue utilizada como control. **B-** Se determinó la expresión de TMEM176B relativa a GAPDH para cada una de las muestras analizadas en ambos grupos. La cuantificación de las bandas de WB fue realizada utilizando el programa Image J. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de TMEM176B entre los grupos. Test de Mann Whitney U.

S4.2. Análisis de la pureza de células CD19+ obtenidas por MACS a partir de PBMCs de LLC

Tabla S4.1. Resultados post-purificación de PBMCs de pacientes con LLC por MACS para dos muestras

| | %IgM+ PRE-MACS | %IgM+ POST-MACS | %IgM+CD5+ PRE-MACS | %IgM+CD5+ POST-MACS |
|-------------|----------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| P275 | 96,6 | 99,8 | 97,3 | 99,8 |
| P279 | 96,3 | 99,6 | 96,6 | 99 |

S4.3. Co-localización de caspasa-1 activa y NLRP3 en células de LLC

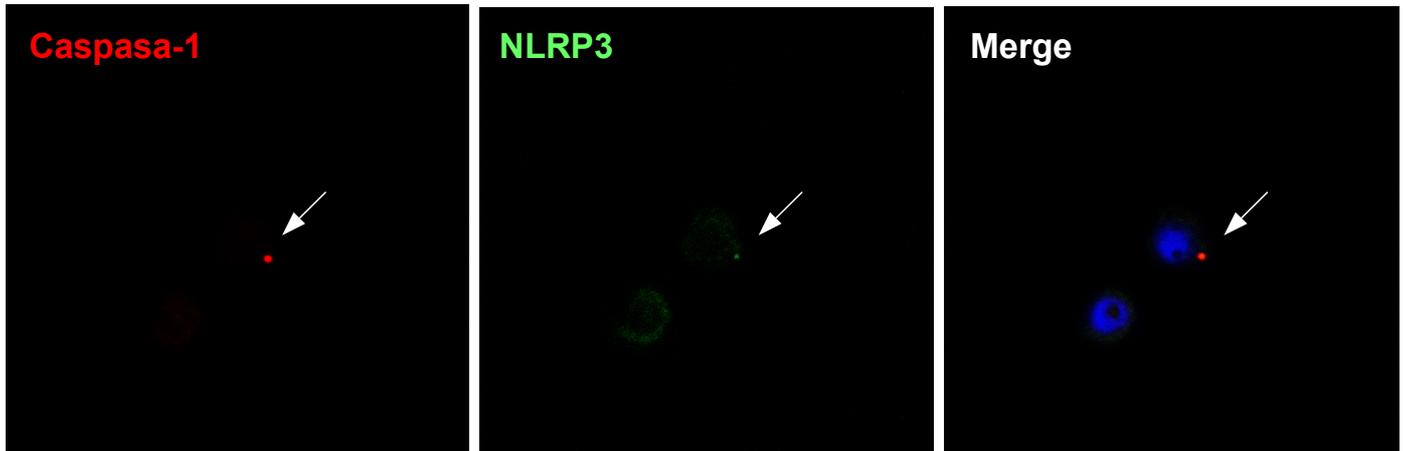


Figura S4.2. Co-localización de caspasa-1 activa y NLRP# en células de LLC. Se detectó la presencia de caspasa-1 activa y NLRP3 en células de sangre periférica de pacientes con LLC por inmunofluorescencia. Rojo: caspasa-1 verde: NLRP3 y azul: DAPI. Aumento 60X, con lente de inmersión en aceite. Microscopio confocal Leica DMI6000, TCS-SP5. Imagen obtenida por Angimar Uriepero.

S4.4. Determinación de LDH en el sobrenadante de cultivo de células de LLC

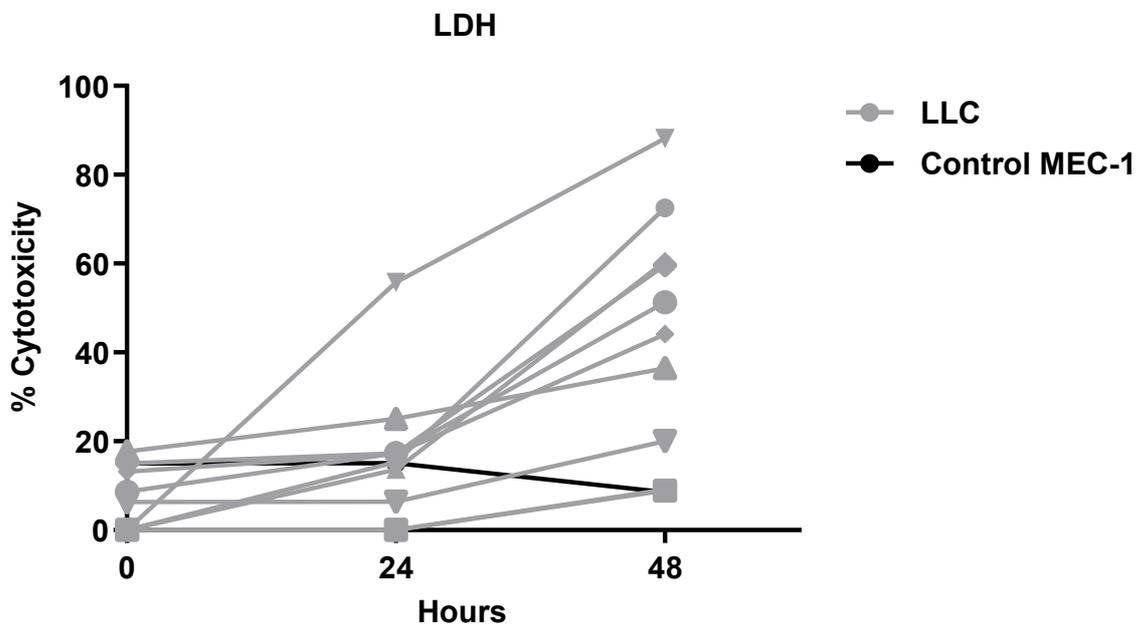


Figura S4.3. Liberación de LDH por células de LLC en cultivo. PBMCs de pacientes con LLC progresiva se colocaron en cultivo y se determinó la presencia de LDH en sobrenadante a las 24 y 48 h utilizando un kit comercial. Como control se utilizó la línea celular MEC-1. En gris se representan los pacientes con LLC, cada símbolo corresponde a un paciente distinto. Se analizaron un total de 10 pacientes. Se observa un incremento significativo de la presencia de LDH en cultivo a las 48 h con respecto a la situación inicial. Medidas realizadas por Angimar Uriepero.

S4.5. Efecto de IL-1 β recombinante humana sobre PBMCs de pacientes con LLC

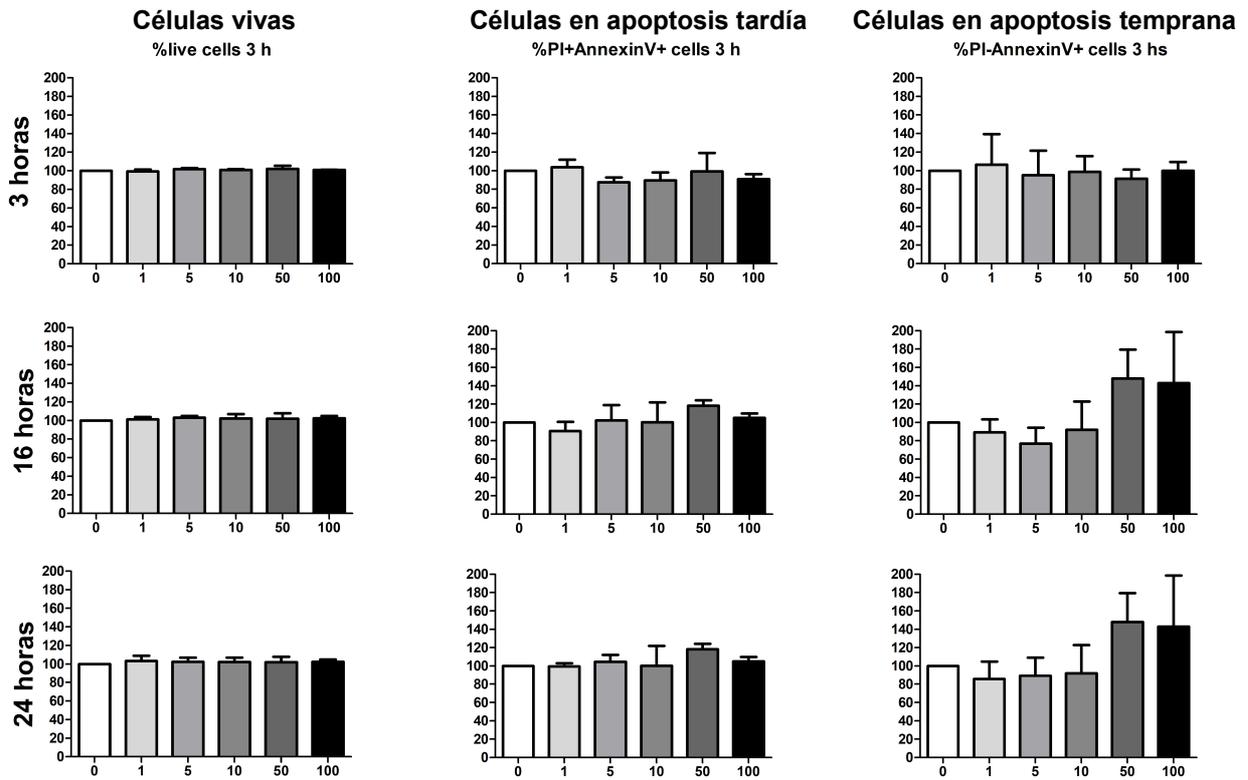


Figura S4.4. Evaluación de la apoptosis de células B de pacientes con LLC tratadas con IL-1 β . PBMCs de pacientes con LLC progresiva fueron incubadas en presencia de cantidades crecientes de IL-1 β humana recombinante (0-100 ng/ml). 3, 16 y 24 h luego fueron analizadas por citometría de flujo para evaluar la muerte celular. Se utilizó anexina V como marcador de apoptosis y yoduro de propidio (PI) como marcador de permeabilización de la membrana celular. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones ensayadas, aunque parecen observarse tendencias.

S4.6. Expresión de TMEM176A por PBMCs de pacientes con LLC en cultivo

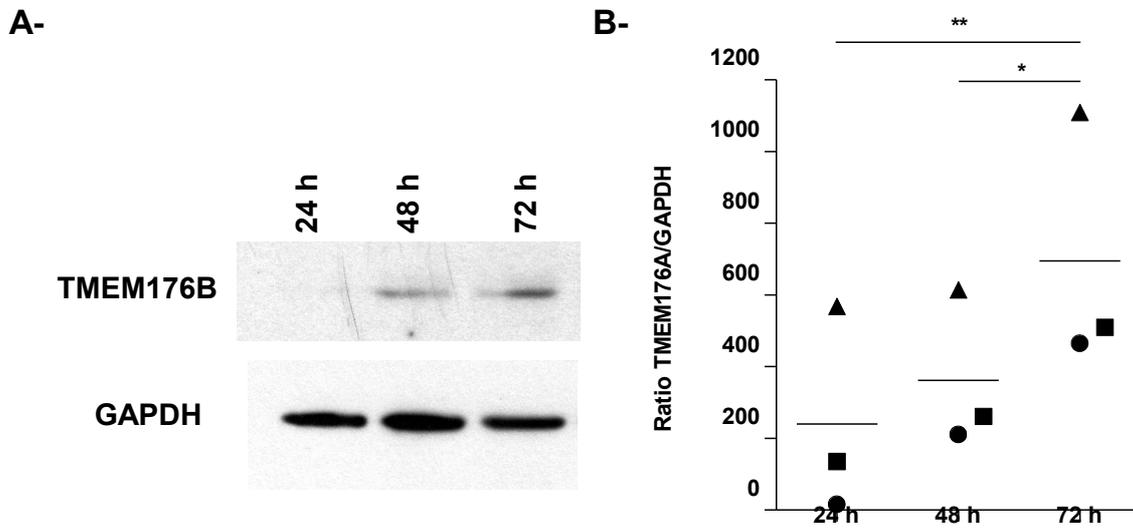


Figura S4.5. Expresión de TMEM176A en PBMCs de LLC en cultivo. A- Se realizó un Western Blot para detectar la presencia de TMEM176A en lisados celulares de PBMC aisladas de individuos con LLC a las 24, 48 y 72 h luego de ponerlas en cultivo. La proteína de expresión constitutiva GAPDH fue utilizada como control. Se muestra un resultado representativo de los encontrados para 3 pacientes diferentes B- Se determinó la expresión de TMEM176A relativa a GAPDH para cada una de las muestras analizadas. La cuantificación de las bandas de WB fue realizada utilizando el programa Image J. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Test de Mann Whitney U.

S4.7. Expresión relativa de citoquinas por BMDCs WT y *Tmem176b*^{-/-} co-incubadas con *Leptospira*

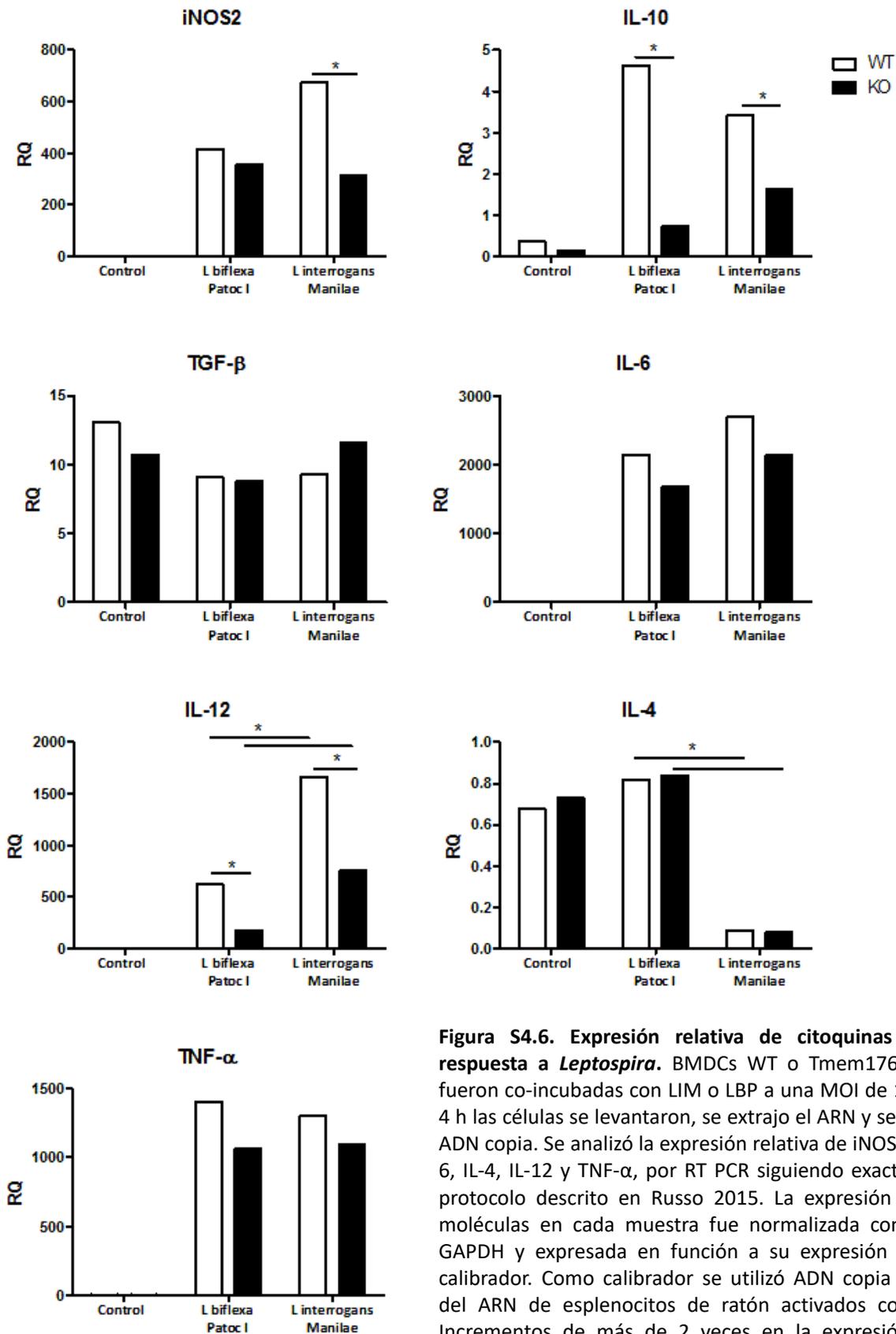


Figura S4.6. Expresión relativa de citoquinas por BMDCs en respuesta a *Leptospira*. BMDCs WT o *Tmem176b*^{-/-} (KO) a día 8 fueron co-incubadas con LIM o LBP a una MOI de 100. Transcurridas 4 h las células se levantaron, se extrajo el ARN y se retrotranscribió a ADN copia. Se analizó la expresión relativa de iNOS2, IL-10, TGF-β, IL-6, IL-4, IL-12 y TNF-α, por RT PCR siguiendo exactamente el mismo protocolo descrito en Russo 2015. La expresión de las diferentes moléculas en cada muestra fue normalizada con la expresión de GAPDH y expresada en función a su expresión relativa contra el calibrador. Como calibrador se utilizó ADN copia obtenido a partir del ARN de esplenocitos de ratón activados con Concanavalina A. Incrementos de más de 2 veces en la expresión relativa fueron considerados como significativos.

S4.8. Fagocitosis de *Leptospira* por BMDC WT y *Tmem176b*^{-/-}

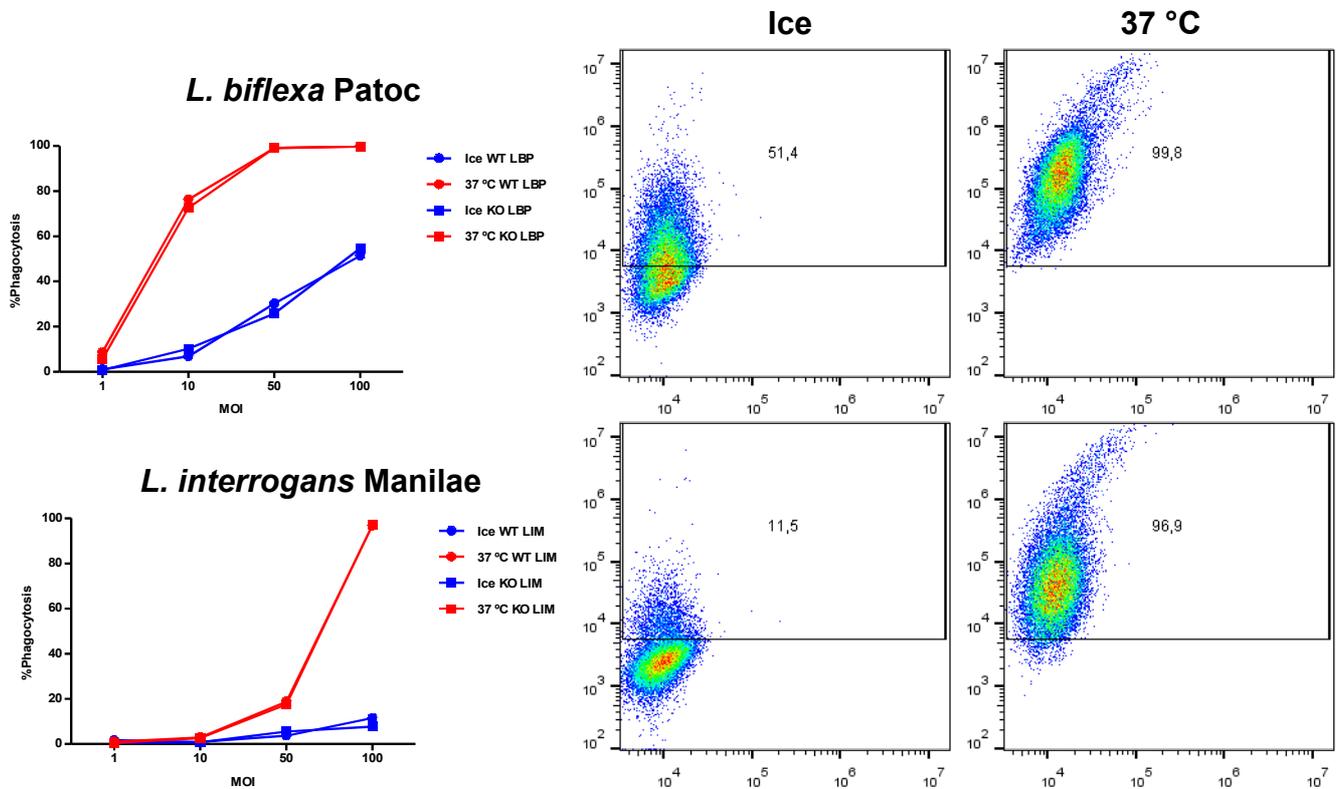


Figura S4.7. Fagocitosis de *Leptospira* por BMDCs. Se realizó un ensayo de fagocitosis de *Leptospira* por BMDCs WT o *Tmem176b*^{-/-} (KO) de acuerdo al protocolo descrito en Sokolovska et al. 2012. Se incubaron las BMDCs con LBP y LIM, cargadas con la sonda Alexa 647, a 1, 10, 50 y 100 de MOI durante 2 horas en hielo o a 37 °C. Luego se lavaron las células y el porcentaje de fagocitosis se determinó por citometría de flujo como el porcentaje de células Alexa 647 positivas. Las células co-incubadas en hielo se utilizaron como control de bacterias adheridas a la superficie celular pero no fagocitadas. Se puede observar que a una MOI de 100 tanto para LIM como LBP el porcentaje de fagocitosis es cercano al 100%. No se observaron diferencias en la fagocitosis en tre células WT y deficientes en *Tmem176b*.

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 9th Edition. **2018**.
- Adler B, Faine S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect Immun*. **1977**; 17:67–72.
- Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. **2010**; 140(3-4):287-96. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
- Aglietti RA, Dueber EC. Recent insights into the molecular mechanisms underlying pyroptosis and gasdermin family functions. *Trends Immunol*. **2017**; 38(4):261-271. doi: 10.1016/j.it.2017.01.003.
- Aguilar-Santelises M, Amador JF, et al. Low IL-1 beta production in leukemic cells from progressive B cell chronic leukemia (B-CLL). *Leuk Res*. **1989**; 13(10):937-42.
- Aguilar-Santelises M, Magnusson R, et al. Expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6 in chronic B lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells from patients at different stages of disease progression. *Clin Exp Immunol*. **1991**; 84(3):422-8.
- Akbari O, De Kruffy RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol*. **2001**; 2(8):725–31. doi: 10.1038/90667.
- Ali MF, Dasari H, Van Keulen VP, Carmona EM. Canonical stimulation of the NLRP3 inflammasome by fungal antigens links innate and adaptive B-lymphocyte responses by modulating IL-1 β and IgM production. *Front Immunol*. **2017**; 8:1504. doi: 10.3389/fimmu.2017.01504
- Anandasabapathy N, Feder R, et al. Classical Flt3L-dependent dendritic cells control immunity to protein vaccine. *J Exp Med*. **2014**; 211(9):1875-91. doi: 10.1084/jem.20131397.
- Ansari MA, Singh VV, et al. Constitutive interferon-inducible protein 16-inflammasome activation during Epstein-Barr virus latency I, II, and III in B and epithelial cells. *J Virol*. **2013**; 87(15):8606-23. doi: 10.1128/JVI.00805-13.
- Ashford DA, Kaiser RM, et al. Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. **2000**; 63(5-6):249-54.
- Bandeira M, Santos CS, et al. Attenuated nephritis in inducible nitric oxide synthase knockout C57BL/6 mice and pulmonary hemorrhage in CB17 SCID and aecombination activating gene 1 knockout C57BL/6 mice infected with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. **2011**; 79:2936–2940. doi: 10.1128/IAI.05099-11.
- Banfi E, Cinco M, Bellini M, Soranzo MR. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. *Microbiol*. **1982**; 128:813–816.
- Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin J. Th17 cells in immunity and autoimmunity. 3rd. *Clin Dev Immunol*. **2013**; 986789. doi: 10.1155/2013/986789.
- Behar SM, Carpenter SM, et al. Orchestration of pulmonary T cell immunity during *Mycobacterium tuberculosis* infection: immunity interrupted. *Semin Immunol*. **2014**; 26(6):559-77. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.003.
- Bezares F, Slavutsky I, et al. Leucemia Linfática Crónica. Las neoplasias linfoides. Buenos Aires. **2009**; 27–48.
- Bharti AR, Nally JE, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. **2003**; 3(12):757-71.

- Bhatia A, Kumar Y. Cancer-immune equilibrium: questions unanswered. *Cancer Microenviron.* **2011**; 4(2):209-17. doi: 10.1007/s12307-011-0065-8.
- Bianchi S, Dighiero G, Pritsch O. Selected topics in Chronic Lymphocytic Leukemia. *InTech.* **2012**:3–19.
- Binet JL, Leporrier M, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. Prognostic significance. *Cancer.* **1977**; 40(2):855–864.
- Blumerman SL, Herzig CTA, Baldwin CL. WC1+ gammadelta T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine. *Eur J Immunol.* **2007**; 37:1204–1216.
- Bolin CA, Zuerner RL, Trueba G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type hardjo-bovis on type hardjobovis infection of cattle. *Am J Vet Res.* **1989**; 50:2004–2008.
- Bolin CA, Alt DP, Zuerner RL. Protection of cattle from renal and genital tract colonization with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **2000**. In: Proceedings of the 21st world buiatrics congress, Punte del Este, Uruguay.
- Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am J Vet Res.* **2001**; 62:996–1000.
- Bottai D, Majlessi L, et al. ESAT-6 secretion-independent impact of ESX-1 genes espF and espG1 on virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* **2011**; 203(8):1155-64. doi: 10.1093/infdis/jiq089.
- Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol.* **2016**; 16(7):407-20. doi: 10.1038/nri.2016.58.
- Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* **1970**;13:1-27.
- Burth P, Younes-Ibrahim M, Gonçalez FH, Costa ER, Faria MV. Purification and characterization of a Na⁺, K⁺ ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* **1997**; 65:1557–1560.
- Caffarena RM CR, Cascelli ES, Martínez ES. Avances en leptospirosis en el Uruguay. *Rev Urug Pat Clín Microbiol.* **1971**; 9:186-194.
- Cahill N, Rosenquist R. Uncovering the DNA methylome in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics.* **2013**; 8:138–148. doi: 10.4161/epi.23439.
- Caligaris-Cappio F, Bertilaccio MT, Scielzo C. How the microenvironment wires the natural history of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol.* **2014**; 24:43-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.06.010.
- Chassin C, Picardeau M, et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen *Leptospira interrogans*. *J Immunol.* **2009**; 183:2669–2677. doi: 10.4049/jimmunol.0900506.
- Cheadle EJ, Lipowska-Bhalla G, et al. A TLR7 agonist enhances the antitumor efficacy of obinutuzumab in murine lymphoma models via NK cells and CD4 T cells. *Leukemia.* **2017**; 31(7):1611-1621. doi: 10.1038/leu.2016.352.
- Chen KW, Gross CJ, et al. The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1 beta maturation without pyroptosis during acute *Salmonella* challenge. *Cell Rep.* **2014**; 8(2):570-82. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.028.
- Chen X, He W -t, et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Res.* **2016**; 26(9):1007-20. doi: 10.1038/cr.2016.100.
- Chiang YH, Wu YC, Chi SC. Interleukin-1 β secreted from betanodavirus-infected microglia caused the death of neurons in giant grouper brains. *Dev Comp Immunol.* **2017**; 70:19-26. doi: 10.1016/j.dci.2017.01.002.

- Chin VK, Ty L, et al. *Microbiol Res.* **2018**; 207:108-115. Leptospirosis in human: Biomarkers in host immune responses. doi: 10.1016/j.micres.2017.11.015.
- Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2007**; 20(3):399–413.
- Chora AA, Fontoura P, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest.* **2007**; 117:438–47. doi: 10.1172/JCI28844.
- Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol.* **2012**; 22(1):23-32. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.12.004.
- Cimmino A, Calin GA, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci.* **2005**; 102: 13944–13949.
- Cinco M, Banfi E, Soranzo MR. Studies on the interaction between macrophages and leptospire. *Microbiol.* **1981**; 124:409–413.
- Ciofani M, Madar A, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* **2012**; 151(2):289-303. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.016
- Condamine T, Le Texier L, et al. Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J Leukoc Biol.* **2010**; 88(3):507-15. doi: 10.1189/jlb.1109738.
- Costa F, Hagan JE, et al. Global morbidity and mortality of Leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* **2015**; 9(9):e0003898. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898.
- Cuajungco MP, Podevin W, et al. Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochem.* **2012**;114(7):705-12. doi: 10.1016/j.acthis.2011.12.006.
- Curti A, Trabanelli S, et al. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood.* **2009**; 113:2394–401. doi: 10.1182/blood-2008-07-144485.
- Deeks ED. Venetoclax: first global approval. *Drugs.* **2016**; 76:979–987. doi: 10.1007/s40265-016-0596-x.
- Diament D, Brunialti MKC, Romero EC, Kallas EG, Salomão R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect Immun.* **2002**; 70:1677–1683.
- Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov.* **2012**; 11(8):633-52. doi: 10.1038/nrd3800.
- Ding J, Wang K, Liu W et al. Pore forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature.* **2016**; 535(7610):111-6. doi: 10.1038/nature18590.
- Domogalla MP, Rostan PV, Raker VK, Steinbrink K. Tolerance through education: how tolerogenic dendritic cells shape immunity. *Front Immunol.* **2017**; 8:1764. doi: 10.3389/fimmu.2017.01764.
- Drujont L, Lemoine A, Moreau A, et al. RORγt+ cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus. *Sci Rep.* **2016**; 6:23682. doi: 10.1038/srep23682.
- Drutman SB, Trombetta ES. Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation *in vivo*. *J Immunol.* **2010**; 185:2140–6. doi: 10.4049/jimmunol.1000642.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* **2002**; 3(11):991-8.
- Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. 1909.

Elinav E, Nowarski R, Thaïss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*. **2013**;13(11):759-71. doi: 10.1038/nrc3611.

Ellis W, McDowell S, Mackie D, Pollock M, Taylor M. Immunity to bovine leptospirosis. **2000**. In: Proceedings of the 21st world buiatrics congress, Punte del Este, Uruguay.

Ellis W. Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. **2015**; 387:99-137.

Eon Kuek L, Leffler M, Mackay GA, Hulett MD. The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. *Immunol Cell Biol*. **2015**. doi: 10.1038/icb.2015.48.

Evavold CL, Ruan J, Tan Y, Xia S, Wu H, Kagan JC. The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity*. **2018**; 48(1):35-44.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.013.

Feng S, Fox D, Man SM. Mechanisms of gasdermin family members in inflammasome signaling and cell death. *J Mol Biol*. **2018**; 430(18 Pt B):3068-3080. doi: 10.1016/j.jmb.2018.07.002.

Fraga TR, Isaac L, Barbosa AS. Complement evasion by pathogenic *Leptospira*. *Front Immunol*. **2016**; 7:623. doi: 10.3389/fimmu.2016.00623.

Ganoza CA, Matthias MA, et al. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*. **2010**; 4(2):e612. doi: 10.1371/journal.pntd.0000612.

Gao D, Han Y, et al. Methylation of TMEM176A is an independent prognostic marker and is involved in human colorectal cancer development. *Epigenetics*. **2017**; 12(7):575-583. doi: 10.1080/15592294.2017.1341027.

Garulli B, Di Mario G, Sciaraffia E, Kawaoka Y, Castrucci MR. Immunogenicity of a recombinant influenza virus bearing both the CD4+ and CD8+ T cell epitopes of ovalbumin. *J Biomed Biotechnol*. **2011**; 2011:497364. doi: 10.1155/2011/497364.

Gaudart N, Ekpo P, Pattanapanyasat K, van Kooyk Y, Engering A. *Leptospira interrogans* is recognized through DC-SIGN and induces maturation and cytokine production by human dendritic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **2008**; 53:359–367. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00437.x.

Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med*. **2009**;15,1170–1178. doi: 10.1038/nm.2028.

Giuroiu I, Weber J. Novel checkpoints and cosignaling molecules in cancer immunotherapy. *Cancer J*. **2017**; 23(1):23-31. doi: 10.1097/PPO.0000000000000241.

Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol*. **2014**; 5:7. doi: 10.3389/fimmu.2014.00007.

Goris MG, Hartskeerl RA. *Curr Protoc Microbiol*. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. **2014**; 32:Unit 12E.5.. doi: 10.1002/9780471729259.mc12e05s32.

Gottschling S, Jauch A, et al. Establishment and comparative characterization of novel squamous cell non-small cell lung cancer cell lines and their corresponding tumor tissue. *Lung Cancer*. **2012**; 75(1):45-57. doi: 10.1016/j.lungcan.2011.05.020.

Gurung P, Lukens JR, Kanneganti TD. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. *Trends Mol Med*. **2015**; 21(3):193-201. doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.008.

Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*. **2000**; 146 (Pt 7):1491-504.

- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol.* **2015**;90(5):446-60. doi: 10.1002/ajh.23979.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **2011**; 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol.* **2015**. doi: 10.1016/j.smim.2015.03.014.
- Hodo Y, Hashimoto S, et al. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics.* **2010**; 95(4):217-23. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.01.004.
- Hoffman HM, Wanderer AA, Broide DH: Familial cold autoinflammatory syndrome: phenotype and genotype of an autosomal dominant periodic fever. *J Allergy Clin Immunol.* **2001**; 108(4):615-620.
- Hua Y, Ju J, et al. Screening for host proteins interacting with *Escherichia coli* O157:H7 EspF using bimolecular fluorescence complementation. *Future Microbiol.* **2018**; 13:37-58. doi: 10.2217/fmb-2017-0087.
- Hulkkonen J, Vilpo J, Vilpo L, Koski T, Hurme M. Interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 plasma levels and cytokine gene polymorphisms in chronic lymphocytic leukemia: correlation with prognostic parameters. *Haematologica.* **2000**; 85(6):600-6.
- Hung C-C, Chang C-T, et al. Upregulation of chemokine CXCL1/KC by leptospiral membrane lipoprotein preparation in renal tubule epithelial cells. *Kidney Int.* **2006a**; 69:1814–1822
- Hung C-C, Chang C-T, et al. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. *Nephrol Dial Transplant.* **2006b**; 21:898–910.
- Isogai E, Kitagawa H, Isogai H, Kurebayashi Y, Ito N. Phagocytosis as a defense mechanism against infection with leptospiras. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A.* **1986**; 261:65–74.
- Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Macrophage activation by leptospiral lipopolysaccharide. *Zentralbl Bakteriell.* **1990**; 273:200–208.
- Izawa T, Kondo T, et al. Fas-independent T-cell apoptosis by dendritic cells controls autoimmune arthritis in MRL/lpr mice. *PLoS One.* **2012**; 7:e48798. doi:10.1371/journal.pone.0048798.
- Jin D, Ojcius DM, et al. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8- and caspase-3-dependent pathways. *Infect Immun.* **2009**; 77:799–809. doi: 10.1128/IAI.00914-08.
- Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev.* **2015**; 265(1):130-42. doi: 10.1111/imr.12287.
- Katsnelson A. Kicking off adaptive immunity: the discovery of dendritic cells. *J Exp Med.* **2006**; 203:1622. doi: 10.1084/jem.2037fta.
- Kayagaki N, Stowe IB, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for noncanonical inflammasome signalling. *Nature.* **2015**; 526(7575):666-71. doi: 10.1038/nature15541.
- Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol.* **2007**; 19:309–14. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.012.
- King AM, Pretre G, et al. High-temperature protein G is an essential virulence factor of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* **2014**; 82(3):1123-31. doi: 10.1128/IAI.01546-13.

- Koizumi N. Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira spp.* that reacted with convalescent mice sera. *J Med Microbiol.* **2006**; 52:585–589.
- Kolb R, Liu GH, Janowski AM, Sutterwala FS, Zhang W. Inflammasomes in cancer: a double-edged sword. *Protein Cell.* **2014**; 5(1):12-20. doi: 10.1007/s13238-013-0001-4.
- Kryczanowsky F, Raker V, Graulich E, Domogalla MP, Steinbrink K. IL-10-modulated human dendritic cells for clinical use: identification of a stable and migratory subset with improved tolerogenic activity. *J Immunol.* **2016**; 197:3607–17. doi: 10.4049/jimmunol.1501769.
- Kumar V, Abbas A, Aster, J. Robbins Basic pathology. 8th Edition. 2012.
- Kurts C, Heath WR, Kosaka H, Miller JF, Carbone FR. The peripheral deletion of autoreactive CD8+T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J Exp Med.* **1998**; 188:415–20. doi: 10.1084/jem.188.2.415.
- Lacroix-Lamande S, d'Andon MF, et al. Downregulation of the Na/K-ATPase pump by leptospiral glycolipoprotein activates the NLRP3 inflammasome. *J Immunol.* **2012**; 188:2805–2814. doi: 10.4049/jimmunol.1101987.
- Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat Immunol.* **2017**; 18(10):1076-1083. doi:10.1038/ni.3829.
- Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev Immunol.* **2013**; 13(6):397-411. doi: 10.1038/nri3452.
- Laurent S, Carrega P, et al. CTLA-4 is expressed by human monocyte-derived dendritic cells and regulates their functions. *Hum Immunol.* **2010**; 71:934–41. doi: 10.1016/j.humimm.2010.07.007.
- Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM, Fouts DE. Leptospiral pathogenomics. *Pathogens.* **2014**; 3(2):280-308. doi: 10.3390/pathogens3020280.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**; 14, 296–326.
- Li S, Ojcius DM, et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate Immun.* **2010**; 16(2):80-92. doi: 10.1177/1753425909105580.
- Lin C, Zhang J. Inflammasomes in Inflammation-Induced Cancer. *Front Immunol.* **2017**; 8:271. doi: 10.3389/fimmu.2017.00271.
- Liu X, Zhang Z, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature.* **2016**; 535(7610):153-8. doi: 10.1038/nature18629.
- Louvet C, Chiffolleau E, et al. Identification of a new member of the CD20/FcεRIβ family overexpressed in tolerated allografts. *Am J Transplant.* **2005**; 5(9):2143-53.
- Lurton J, Rose TM, Raghu G, Narayanan AS. Isolation of a gene product expressed by a subpopulation of human lung fibroblasts by differential display. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1999**; 20(2):327-31.
- Maeda Y, Fujimura L, et al. Role of Clast1 in development of cerebellar granule cells. *Brain Res.* **2006**; 1104(1):18-26.
- Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev.* **2017**; 277(1):61-75. doi: 10.1111/imr.12534.
- Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* **2007**; 7:31–40.

- Marinho M, Oliveira-Júnior IS, Monteiro CMR, Perri SH, Salomão R. Pulmonary disease in hamsters infected with *Leptospira interrogans*: histopathologic findings and cytokine mRNA expressions. *Am J Trop Med Hyg.* **2009**; 80:832–836.
- Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β . *Mol Cell.* **2010**; 10:417–426.
- Matsui M, Rouleau V, Bruyère-Ostells L, Goarant C. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. *Infect Immun.* **2011**; 79:4480–4492. doi: 10.1128/IAI.05727-11.
- Matsui M, Roche L, et al. Cytokine and chemokine expression in kidneys during chronic leptospirosis in reservoir and susceptible animal models. *PLoS One.* **2016**; 11(5):e0156084. doi: 10.1371/journal.pone.0156084.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* **2008**; 454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201.
- Meny P, Menéndez C, Quintero J, et al. Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **2017**; 21; 59:e79.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* **2013**; 31:563–604. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
- Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun.* **1997**; 65:729–738.
- Miranda KA, Vasconcelos LRS, et al. High levels of serum mannose-binding lectin are associated with the severity of clinical signs of leptospirosis. *Braz J Med Biol Res.* **2009**; 42:353–357.
- Mitchell G, Chen C, Portnoy DA. Strategies used by bacteria to grow in macrophages. *Microbiol Spectr.* **2016**; 4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0012-2015.
- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* **2014**; 27:16-25. doi:10.1016/j.coi.2014.01.004.
- Morel P, Butterfield L. Dendritic cell control of immune responses. *Front Immunol.* **2015**. doi: 10.3389/fimmu.2015.00042.
- Munn DH, Sharma MD, et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science.* **2002**; 297:1867–70. doi: 10.1126/science.1073514.
- Munoz-Planillo R, Kuffa P, et al. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity.* **2013**, 38(6):1142-1153. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.016.
- Nahori MA, Fournié-Amazouz E, et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol.* **2005**; 175(9):6022-31.
- Naiman BM, Alt DP, Bolin CA, Zuerner RL, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Infect Immun.* **2001**; 69:7550–7558.
- Naiman BM, Blumerman S, et al. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. *Infect Immun.* **2002**; 70:6147–6157.
- Nakajima H, Takenaka M, et al. Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. *Kidney Int.* **2002**;61:1577-1587.

- Nally JE, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Lethal infection of C3H/HeJ and C3H/SCID Mice with an isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Infect Immun*. **2005**; 73:7014–7017.
- Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3 – potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol*. **2015**; 15:45–56. doi: 10.1038/nri3790.
- Nguyen MT, Götz F. Lipoproteins of Gram-positive bacteria: key players in the immune response and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*. **2016**; 80(3):891-903. doi: 10.1128/MMBR.00028-16.
- Nickles D, Chen HP, et al. Blood RNA profiling in a large cohort of multiple sclerosis patients and healthy controls. *Hum Mol Genet*. **2013**; 22(20):4194-205. doi: 10.1093/hmg/ddt267.
- Niller HH, Masa R, Venkei A, Mészáros S, Minarovits J. Pathogenic mechanisms of intracellular bacteria. *Curr Opin Infect Dis*. **2017**; 30(3):309-315. doi: 10.1097/QCO.0000000000000363.
- Nishio J, Honda K. Immunoregulation by the gut microbiota. *Cell Mol Life Sci*. **2012**; 69(21):3635-50. doi:10.1007/s00018-012-0993-6.
- O'Garra A, Redford PS, et al. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. **2013**; 31:475-527. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095939.
- Okumura CY, Nizet V. Subterfuge and sabotage: evasion of host innate defenses by invasive gram-positive bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol*. **2014**; 68:439-58. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155711.
- Orsini F, De Blasio D, Zangari R, Zanier ER, De Simoni MG. Versatility of the complement system in neuroinflammation, neurodegeneration and brain homeostasis. *Front Cell Neurosci*. **2014**; 8:380. doi: 10.3389/fncel.2014.00380.
- Otsubo C, Otomo R, et al. TSPAN2 is involved in cell invasion and motility during lung cancer progression. *Cell Rep*. **2014**; 7(2):527-38. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.027.
- Page DB, Postow MA, Callahan MK, Allison JP, Wolchok JD. Immune modulation in cancer with antibodies. *Annu Rev Med*. **2014**; 65:185-202. doi: 10.1146/annurev-med-092012-112807.
- Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*. **2007**; 20(3):284-92.
- Pappas CJ, Benaroudj N, Picardeau M. A replicative plasmid vector allows efficient complementation of pathogenic *Leptospira* strains. *Appl Environ Microbiol*. **2015**; 81(9):3176-81. doi: 10.1128/AEM.00173-15.
- Pereira MM, Andrade J, Marchevsky RS, Ribeiro dos Santos R. Morphological characterization of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae: Defect of CD4+ and CD8+ T-cells are prognosticators of the disease progression. *Exp Toxicol Pathol*. **1998**; 50:191–198.
- Perregaux DG, Gabel CA: Human monocyte stimulus-coupled IL-1beta posttranslational processing: modulation via monovalent cations. *The American journal of physiology*. **1998**; 275(6 Pt 1):C1538-1547.
- Pistoia V, Cozzolino F, et al. In vitro production of interleukin 1 by normal and malignant human B lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136(5):1688-92.
- Place DE, Kanneganti TD. Recent advances in inflammasome biology. *Curr Opin Immunol*. **2018**; 50:32-38. doi: 10.1016/j.coi.2017.10.011.
- Prêtre G, Olivera N, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the pathogenesis of experimental leptospirosis. *Microb Pathog*. 2011; 51:203–208. doi: 10.1016/j.micpath.2011.03.011.

- Puche, R, Ferrés, I, Caraballo, L, et al. *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2018**; 68(2), 513–517.
- Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Allison JP. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev*. **2011**; 241(1):104-18. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01007.x.
- Radostits OM, Mayhew IGJ, Houston DM. Examen y diagnóstico clínico en veterinaria. Ediciones Harcourt. **2002**; p771.
- Raker VK, Domogalla MP, Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells for regulatory T cell induction in man. *Front Immunol*. **2015**; 6:569. doi: 10.3389/fimmu.2015.00569.
- Repiso M, Gil A, Bañales P, et al. Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan la reproducción en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria*. **2005**; 40:5-28, 2005.
- Ristow P, Bourhy P, et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog*. **2007**; 3(7):e97.
- Roberts AW, Huang D. Targeting BCL2 with BH3 mimetics: basic science and clinical application of Venetoclax in Chronic Lymphocytic Leukemia and related B cell malignancies. *Clin Pharmacol Ther*. **2017**; 101(1):89-98. doi: 10.1002/cpt.553.
- Rooijackers SH, van Strijp JA. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol*. **2007**; 44(1-3):23-32.
- Roychoudhuri R, Eil RL, Restifo NP. The interplay of effector and regulatory T cells in cancer. *Curr Opin Immunol*. **2015**; 33:101-11. doi: 10.1016/j.coi.2015.02.003.
- Rozovski U, Keating MJ, Estrov Z. Targeting inflammatory pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. **2013**; 88(3):655-66. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.07.011.
- Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell*. **2015**; 27(4):462-72. doi: 10.1016/j.ccell.2015.02.015.
- Rusakiewicz S, Semeraro M, et al. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. **2013**;73(12):3499-510. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0371.
- Russo S. Caracterización de nuevos blancos moleculares para modular la respuesta inmune anti-tumoral. Tesis de Maestría PEDECIBA Biología. Montevideo, Uruguay. **2015**.
- Salaro E, Rambaldi A, et al. Involvement of the P2X7-NLRP3 axis in leukemic cell proliferation and death. *Sci Rep*. **2016**; 6:26280. doi: 10.1038/srep26280.
- Sborgi L, Ruhl S, et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J*. **2016**; 35(16):1766-78. doi: 10.15252/embj.201694696.
- Schelotto F, et al. A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **2012**; 54(2):69-75.
- Schoenlaub L, Cherla R, Zhang Y, Zhang G. *Coxiella burnetii* avirulent nine mile phase II induces Caspase-1-dependent pyroptosis in murine peritoneal B1a B cells. *Infect Immun*. **2016**; 84(12):3638-3654.
- Schwartz RH. Historical overview of immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **2012**; 4(4):a006908. doi: 10.1101/cshperspect.a006908.

- Scrive R, Vasile M, Bartosiewicz I, Valesini G. Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. *Autoimmun Rev*. **2011**; 10(7):369-74. doi: 10.1016/j.autrev.2010.12.006.
- Segovia M, Louvet C, et al. Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am J Transplant*. **2014**; 14(5):1021-31. doi: 10.1111/ajt.12708.
- Shi J, Zhao Y, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*. **2014**; 514(7521):187-92. doi: 10.1038/nature13683.
- Shi J, Zhao Y, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. **2015**; 526(7575):660-5. doi: 10.1038/nature15514.
- Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-mediated programmed necrotic cell death. *Trends Biochem Sci*. **2017**; 42(4):245-254. doi: 10.1016/j.tibs.2016.10.004.
- Shortman K, Heath WR. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol*. **2001**; 2:988-9. doi:10.1038/ni1101-988.
- Shou D, Wen L, et al. Suppressive role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies. *Oncotarget*. **2016**; 7(39):64505-64511. doi: 10.18632/oncotarget.11352.
- Singh VV, Kerur N, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency in endothelial and B cells activates gamma interferon-inducible protein 16-mediated inflammasomes. *J Virol*. **2013**; 87(8):4417-31. doi: 10.1128/JVI.03282-12.
- Sokolovska A, Becker CE, Stuart LM. Measurement of phagocytosis, phagosome acidification, and intracellular killing of *S. aureus*. *Curr Protoc Immunol*. **2012**; Chapter 14:Unit14.30. doi: 10.1002/0471142735.im1430s99.
- Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood*. **2002**; 99:2468-76. doi: 10.1182/blood.V99.7.2468.
- Suanes, AS. Leptospirosis bovina: enfermedad, epidemiología y diagnóstico serológico. Publicación académica da Academia de Medicina Y medicina Veterinaria: Leptospirosis. Montevideo, Uruguay. **2013**.
- Sun CM, Hall JA, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*. **2007**; 204(8):1775-85. doi: 10.1084/jem.20070602.
- Sun M, He C, Cong Y, Liu Z. Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal Immunol*. **2015**; 8(5):969-978. doi:10.1038/mi.2015.49.
- Surana NK, Kasper DL. Deciphering the tête-à-tête between the microbiota and the immune system. *J Clin Invest*. **2014**; 124(10):4197-203. doi:10.1172/JCI72332.
- Svensson A, Patzi Churqui M, Schlüter K, Lind L, Eriksson K. Maturation-dependent expression of AIM2 in human B-cells. *PLoS One*. **2017**; 12(8):e0183268. doi: 10.1371/journal.pone.0183268.
- Taabazuing CY, Okondo MC, Bachovchin DA. Pyroptosis and apoptosis pathways engage in bidirectional crosstalk in monocytes and macrophages. *Cell Chem Biol*. **2017**; 24(4):507-514.e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.03.009.
- Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* 2013; 339(6116):166-72. doi: 10.1126/science.1230720.
- Tamura M, Tanaka S, et al. Members of a novel gene family, Gsdm, are expressed exclusively in the epithelium of the skin and gastrointestinal tract in a highly tissue-specific manner. *Genomics*. **2007**; 89(5):618-29.
- Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., et al. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. **2018**; 816.

- Toma C, Okura N, Takayama C, Suzuki T. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. *Cell Microbiol.* **2011**; 13:1783–1792. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01660.x.
- Torgerson PR, Hagan JE, et al. Global burden of Leptospirosis: estimated in terms of disability adjusted life years. *PLoS Negl Trop Dis.* **2015**; 9(10):e0004122. doi: 10.1371/journal.pntd.0004122.
- Travis MA, Reizis B, et al. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature.* **2007**; 449:361–5. doi:10.1038/nature06110.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* **1985**; 228:1440–1443.
- Uggla C, Aguilar-Santelises M, Rosén A, Mellstedt H, Jondal M. Spontaneous production of interleukin 1 activity by chronic lymphocytic leukemic cells. *Blood.* **1987**; 70(6):1851-7.
- van Keimpema M, Grüneberg LJ, Mokry M, et al. FOXP1 directly represses transcription of proapoptotic genes and cooperates with NF- κ B to promote survival of human B cells. *Blood.* **2014**; 124(23):3431-40. doi: 10.1182/blood-2014-01-553412.
- Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasomes activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol.* **2015**; 25(5):308-15. doi: 10.1016/j.tcb.2014.12.009.
- Vernel-Pauillac F, Goarant C. Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* **2010**; 4:e582. doi: 10.1371/journal.pntd.0000582.
- Vieira ML, Fernandes LG, et al. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. *FEMS Microbiol Lett.* **2014**; 352(2):129-39. doi: 10.1111/1574-6968.12349.
- Vinay DS, Ryan EP, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* **2015**; 35 Suppl:S185-S198. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004.
- Vinh T, Adler B, Faine S. The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: *in vitro* and *in vivo* studies. *Pathology.* **1982**; 14:463–468.
- Vinh T, Adler B, Faine S. Glycolipoprotein cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *J Gen Microbiol.* **1986**; 132:111–123.
- Viriyakosol S, Matthias MA, Swancutt MA, Kirkland TN, Vinetz JM. Toll-Like Receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to *in vivo* control of leptospiral burden. *Infect Immun.* **2006**; 74:887–895.
- Vogler M, Dinsdale D, Dyer MJS, Cohen GM. ABT-199 selectively inhibits BCL2 but not BCL2L1 and efficiently induces apoptosis of chronic lymphocytic leukaemic cells but not platelets. *Br J Haematol.* **2013**; 163:139–142. doi: 10.1111/bjh.12457.
- Wagenaar JFP, Gasem MH, et al. Soluble ST2 levels are associated with bleeding in patients with severe leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* **2009**; 3:e453. doi: 10.1371/journal.pntd.0000453.
- Wagenaar JFP, Goris MGA, et al. Long pentraxin PTX3 is associated with mortality and disease severity in severe leptospirosis. *J Infect.* **2009**; 58:425–432. doi: 10.1016/j.jinf.2009.04.004.
- Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* **2011**; 11(12):852-63. doi: 10.1038/nri3108.

- Wang Y, Han KJ, et al. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J. Immunol.* **2002**;169:1102-1109.
- Wang H, Wu Y, et al. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF- κ B signaling pathways. *PLoS ONE.* **2012**; 7:e42266. doi: 10.1371/journal.pone.0042266.
- Wang Y, Zhang Y, Herman JG, Linghu E, Guo M. Epigenetic silencing of TMEM176A promotes esophageal squamous cell cancer development. *Oncotarget.* **2017**; 8(41):70035-70048. doi: 10.18632/oncotarget.19550.
- Werts C. Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. *Chang Gung Med J.* **2010**; 33(6):591-601.
- Wilson NS, El-Sukkari D, Villadangos JA. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood.* **2004**; 103:2187–95. doi: 10.1182/blood-2003-08-2729.
- Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. Innate immune recognition of cancer. *Annu Rev Immunol.* **2015**; 33:445-74. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112043.
- Wu J, Horuzsko A. Expression and function of immunoglobulin-like transcripts on tolerogenic dendritic cells. *Hum Immunol.* 2009; 70:353–6. doi: 10.1016/j.humimm.2009.01.024.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* **2013**; 496(7446):445-55. doi: 10.1038/nature12034.
- Xia B, Sun L, et al. A new model of self-resolving leptospirosis in mice infected with a strain of *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis harboring LPS signaling only through TLR4. *Emerg Microbes Infect.* **2017**; 6(5):e36. doi: 10.1038/emi.2017.16.
- Yan XJ, Dozmorov I, et al. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **2011**; 118(19):5201-10. doi: 10.1182/blood-2011-03-342436.
- Zanoni I, Granucci F. Regulation of antigen uptake, migration, and lifespan of dendritic cell by toll-like receptors. *J Mol Med.* **2010**; 88:873–80. doi: 10.1007/s00109-010-0638-x.
- Zanoni I, Tan Y, et al. An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science.* **2016**; 352(6290):1232-6. doi: 10.1126/science.aaf3036.
- Zarantonelli L, Suanes A, Meny P, et al. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 13;12(9).
- Zhang Q, Vignali DA. Co-stimulatory and co-inhibitory pathways in autoimmunity. *Immunity* **2016**; 44(5):1034-51. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.017.
- Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol.* **2012**;13(4):343-51. doi: 10.1038/ni.2224.
- Zuccolo J, Bau J, et al. Phylogenetic analysis of the MS4A and TMEM176 gene families. *PLoS One.* **2010**;5(2):e9369. doi: 10.1371/journal.pone.0009369.
- Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV, Thacker TC, Olsen SC. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clin Vacc Immunol.* **2011**; 18:684–691. doi: 10.1128/CVI.00288-10.

Zuerner RL. Host response to *leptospira* infection. Curr Top Microbiol Immunol. **2015**; 387:223-50. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_9.