



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Tesis de Maestría en Biología Celular y Molecular

# Caracterización del perfil molecular y celular inducido durante la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*.

Lic. María Paula Céspedes

Supervisora: Dra. Analía Rial

Co- Supervisor: Dr. Alejandro Chabalgoity

Departamento de Desarrollo Biotecnológico  
Instituto de Higiene, Facultad de Medicina  
Montevideo, Uruguay  
Setiembre 2019

*“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas  
De pronto, cambiaron todas las preguntas”*

Gracias a todos los que me acompañaron en este proceso.

Principalmente gracias a mi mamá, por el apoyo incondicional. Quien a lo largo de este camino se convirtió en parte fundamental de mi “equipo de investigación” preguntándome cómo me dieron los ELISAs, si me dieron bien las qPCRs o si la citometría de flujo fue exitosa! Gracias mamá por estar todos los días y en cada momento. Sos mi gran compañera y te adoro con el alma!

Gracias a Analía no sólo por su dirección sino por su afecto y por su don de gente. Esta carrera tiene más momentos frustrantes que gratos y sin embargo a lo largo de este proceso descubrí un ser humano hermoso lleno de fortalezas y que me ha enseñado mucho y me ha apoyado más allá de lo profesional. Gracias Ana! Te quiero muchísimo!

Quiero destacar también el apoyo de mis primos Lucía y Gonzalo quienes también me han apoyado incondicionalmente.

A Lu y a Flor, amigas que me dejaron este camino, amigas de fierro, gracias por el apoyo!

A todas mis chiquis del laboratorio!!! Las adoro y fue divino compartir cada mate, cada momento! En especial agradecerle a Vic que llegó en un momento difícil de esta tesis! A Amy y A Thais por todos los consejos y el apoyo!

A Laura, María, Lu Yim, Andrea quienes también estuvieron en cada consulta y dedicaron su tiempo a ayudarme a resolver los desafíos científicos. Gracias por todo el cariño!

A mi linda Marichu con quien compartí tantos mates y tantas charlas preciadas y enriquecedoras.

A quienes me apoyaron desde un lugar más silencioso... Fiona, Mili, mis grandes compañeras de vida.

A Taborda quien cuida de nosotros cada fin de semana y cada feriado, y desde su lugar y desde su humildad también me ha enseñado mucho.

A Alejandro por permitirme desarrollar mi tesis de grado y mi posgrado en su laboratorio.

Gracias a todos por tanto cariño, porque siempre que vuelvo recibo sonrisas y mucho afecto y eso me reconforta el alma.

# Contenido

Resumen .....	6
<b>Capítulo 1: Introducción .....</b>	<b>7</b>
1.1. Distribución general del sistema respiratorio.....	7
1.2. Barreras de defensa naturales del sistema respiratorio frente a patógenos externos.....	7
1.3. Infecciones del tracto respiratorio y su relevancia a nivel mundial.....	8
1.3.1. Neumonía adquirida en la comunidad .....	9
1.3.2. Etiología de la NAC .....	10
1.4. <i>S. pneumoniae</i> : cuarto patógeno más frecuente de infección mortal.....	10
1.4.1. Vacunas anti-neumocóccicas .....	11
1.4.2. Factores de virulencia.....	12
1.4.3. Transmisión de neumococo entre hospederos .....	14
1.5. Colonización Nasofaríngea .....	16
1.5.1. Establecimiento de la colonización nasofaríngea por neumococo.....	16
1.5.2. Inmunidad humoral y celular frente a la colonización.....	18
1.5.3. Células Th17, productoras de IL-17A y su rol durante la colonización nasofaríngea por neumococo.....	21
<b>Capítulo 2. Objetivos .....</b>	<b>26</b>
2.1. Objetivo General .....	26
2.1.1. Objetivos específicos .....	26
<b>Capítulo 3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>27</b>
3.1. Cepas Bacterianas .....	27
3.1.1. Crecimiento y mantenimiento de las cepas.....	27
3.2. Ratones.....	28
3.2.1. Genotipado de la cepa <i>Il17a<sup>-/-</sup></i> .....	28
3.2.2. Complementación de animales <i>Il17a<sup>-/-</sup></i> con rIL-17A.....	29
3.3. Colonización por Pn1.....	30

3.3.1. Preparación del inóculo.....	30
3.3.2. Infección intranasal. ....	30
3.4. Necropsia y obtención de muestras. ....	30
3.4.1. Extracción de sangre y obtención de suero.....	30
3.4.2. Obtención de lavado nasofaríngeo (NAL).....	31
3.4.3. Obtención de tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT).....	31
3.5. Determinación de carga bacteriana en NAL. ....	31
3.6. Evaluación de la respuesta inmune .....	32
3.6.1. Detección de anticuerpos séricos anti polisacárido 1 y anti polisacárido C.....	32
3.6.2. Depleción de células CD4 <sup>+</sup> . ....	32
3.6.3. Extracción de ARN, RT y qPCR. ....	33
3.7. Citometría de flujo.....	36
3.7.1. Procesamiento y análisis de muestras de NAL y NALT.....	36
3.7.2. Protocolo general de marcado de anticuerpos .....	36
3.7.3. Protocolo para marcar células T reguladoras .....	36
3.8. ELISA para determinación de citoquinas .....	37
3.9. Evaluación de la actividad bactericida de los macrófagos. ....	37
3.9.1. Cultivo de células L929. ....	37
3.9.2. Extracción de células de médula ósea. ....	38
3.9.3. Diferenciación de BMDM a macrófagos. ....	38
3.9.4. Obtención de macrófagos peritoneales .....	38
3.9.5. Evaluación de la actividad microbicida de macrófagos. ....	39
3.10. Depleción de microbiota. ....	39
3.11. Análisis Estadístico.....	39
<b>Capítulo 4. Resultados .....</b>	<b>41</b>
4.1. Modelo de colonización nasofaríngea por <i>S. pneumoniae</i> serotipo 1 .....	41
4.2. Restablecimiento del fenotipo salvaje.....	43
4.3 Respuesta humoral frente a la colonización por Pn1. ....	45

4.3.1. Evaluación de la producción de anticuerpos específicos contra polisacárido capsular1 (PnPs1) y polisacárido C (Ps-C) .....	45
4.3.2. Respuesta de anticuerpos específicos contra PnPs1 en animales depletados de células TCD4 <sup>+</sup> .....	52
4.4. Perfil transcripcional asociado a la colonización nasofaríngea por <i>S. pneumoniae</i> . ....	55
4.4.1. Evaluación de la expresión del ARNm de péptidos antimicrobianos durante la colonización por Pn1 .....	55
4.4.2. Identificación del perfil de respuesta a nivel transcripcional luego de la colonización con Pn1. ....	57
4.5. Detección de la producción de IL-4 y TGFβ por ELISA .....	65
4.6. Análisis por citometría de flujo de distintas poblaciones celulares en respuesta a la colonización por neumococo. ....	66
4.6.1. Evaluación de la población de neutrófilos Ly6G <sup>+</sup> /Cd11b <sup>+</sup> .....	66
4.6.2. Evaluación de la población de macrófagosF4/80 <sup>+</sup> /CD11c <sup>+</sup> .....	67
4.6.3. Evaluación de la población de células T reguladoras CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /FoxP3 <sup>+</sup> . ....	68
4.7. Evaluación de la capacidad bactericida de macrófagos peritoneales y derivados de médula ósea de ambas cepas de animales. ....	70
4.8. Evaluación de la producción de ROS por parte de los macrófagos peritoneales.....	72
4.9. Depleción de la microbiota intestinal en ambas cepas de animales. ....	73
<b>Capítulo 5. Discusión general.....</b>	<b>75</b>
<b>Capítulo 6. Conclusión general.....</b>	<b>79</b>
<b>Capítulo 7. Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>80</b>

# Resumen

*Streptococcus pneumoniae* continúa siendo el principal agente etiológico de la neumonía comunitaria. Este patógeno exclusivamente humano coloniza de manera asintomática la nasofaringe, siendo este un pre-requisito para el desarrollo de enfermedad, como puede ser la neumonía neumocócica.

En este trabajo de maestría se mostró que IL-17A es esencial para la eliminación de la colonización nasofaríngea por neumococo serotipo 1 mediante la utilización de una cepa murina *Il17a* deficiente (*Il17a<sup>-/-</sup>*) y su cepa singénica salvaje. Los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* permanecen colonizados en el tiempo mientras que la cepa salvaje elimina la colonización a las tres semanas. En este sentido se evaluó el rol de esta citoquina tanto a nivel humoral así como también a nivel transcripcional y celular. Los resultados obtenidos descartan que la ausencia de IL17A impida desarrollar una respuesta humoral específica contra el polisacárido capsular del serotipo 1, ya que ambas cepas producen similares niveles de anticuerpos en respuesta a la colonización. Por otra parte, a nivel transcripcional se observó que la cepa salvaje tiene una respuesta de tipo TH17, en donde se vio más aumentada la expresión relativa de *Il17a*, *Il17f*, *Rorgt*, *Il22*, *Il23*, entre otros. Sin embargo, la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* mostró un perfil de tipo regulador debido a que genes tales como *Tgfb*, *Il10* o *Il4* se vieron más expresados. Esto último fue confirmado luego por ELISA. El reclutamiento a nivel celular fue similar en lo que respecta a los neutrófilos, lo que sugiere que éstos no serían los responsables de la eliminación del neumococo, si bien no se discute su colaboración en ese proceso. Las células T reguladoras tampoco estarían jugando un rol decisivo ya que ambas cepas muestran igual presencia de este tipo celular en el sitio de infección. La diferencia radica en el reclutamiento de los macrófagos el cual se vio ampliamente incrementado en la cepa salvaje. Dado el entorno regulador que mostró la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* a nivel de citoquinas que reclutan y activan a los macrófagos, nos planteamos la hipótesis de que en esta cepa los macrófagos podrían ser mayoritariamente de tipo M2 y por este motivo no ser eficientes a la hora de eliminar la colonización. A nivel transcripcional se vio que genes relacionados con la diferenciación hacia el perfil M1, más específicamente iNOS, se veía más expresado en la cepa salvaje, si bien no se encontraron diferencias en uno de los genes asociados al perfil M2 (CD206). A continuación, se evaluó in vitro la capacidad bactericida de macrófagos derivados de médula ósea y de macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ambas cepas. Los resultados obtenidos fueron robustos mostrando que los macrófagos de la cepa salvaje son superiores a la hora de eliminar a la bacteria mientras que los de la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* mantuvieron recuentos similares a los del control de bacterias sin células.

# Capítulo 1: Introducción

## 1.1. Distribución general del sistema respiratorio.

El área superficial del sistema respiratorio adulto es de 80 a 100 m<sup>2</sup> aproximadamente y se extiende desde las fosas nasales hasta los alvéolos pulmonares (Colebatch & Ng, 1992). Es un sistema complejo de órganos responsable del intercambio de oxígeno y dióxido de carbono (Man, de Steenhuijsen Piters, & Bogaert, 2017). Se divide arbitrariamente en vías altas o superiores y en vías bajas o inferiores. Las vías superiores comprenden las áreas anatómicas anteriores a la laringe, incluyendo la nasofaringe, orofaringe, laringe, epiglotis, oído externo y medio, y los senos paranasales, mientras que las bajas incluyen todas las estructuras posteriores a la laringe tales como son la tráquea y, dentro de los pulmones, los bronquios, los bronquiolos y los alvéolos. El intercambio gaseoso se produce en la superficie de cada alvéolo mediante una red capilar que transporta la sangre que llega a través de las venas desde otras partes del organismo (Yuksel & Turkeli, 2017). El desarrollo anatómico y la maduración del tracto respiratorio humano es un proceso complejo que se lleva a cabo en múltiples etapas, tanto en la vida prenatal como postnatal. Este proceso de maduración depende, en parte, de la exposición a desencadenantes microbianos y ambientales, y da como resultado un sistema orgánico altamente especializado que contiene varios nichos distintos, cada uno de los cuales está sujeto a gradientes microbianos, celulares y fisiológicos específicos (Man et al., 2017).

## 1.2. Barreras de defensa naturales del sistema respiratorio frente a patógenos externos.

Debido al fenómeno de la ventilación, el pulmón y las vías aéreas están continuamente expuestos a microorganismos ambientales que, en ocasiones, alteran o superan las barreras anatómicas naturales con las que cuenta el sistema respiratorio. La nariz, y su intrincada estructura, hacen que se formen corrientes de aire que favorecen el depósito de partículas en la mucosa nasal. El sistema mucociliar o la tos ayudan a eliminar los microorganismos que ingresan en el tracto respiratorio (D.-Y. Wang, Li, Yan, Li, & Shi, 2015). Sustancias con acción antimicrobiana, como los péptidos antimicrobianos, junto con el sistema de complemento y la inmunidad innata ayudan a reforzar esta acción. Cuando un patógeno

invade el epitelio respiratorio produce inicialmente en el hospedero una respuesta inflamatoria aguda que posteriormente puede derivar o no en una enfermedad.

Por otra parte, la microbiota también actúa como una barrera de defensa natural. La misma ha evolucionado conjuntamente con los humanos durante millones de años y se encuentra en todas las superficies mucosas del cuerpo humano, incluida la del tracto respiratorio. Los sitios específicos del tracto respiratorio contienen comunidades bacterianas especializadas que se cree que tienen un papel importante en el mantenimiento de la salud humana (Man et al., 2017). Si bien hasta hace pocos años se creía que las vías aéreas inferiores, espacios bronco alveolares y pulmón, permanecían estériles, hoy se sabe que existe una microbiota normal en ellos (Dickson & Huffnagle, 2015). La microbiota del pulmón influye en el desarrollo de enfermedades locales y puede tener un impacto a nivel distal, por ejemplo, en la microbiota intestinal (Schuijt et al., 2016b).

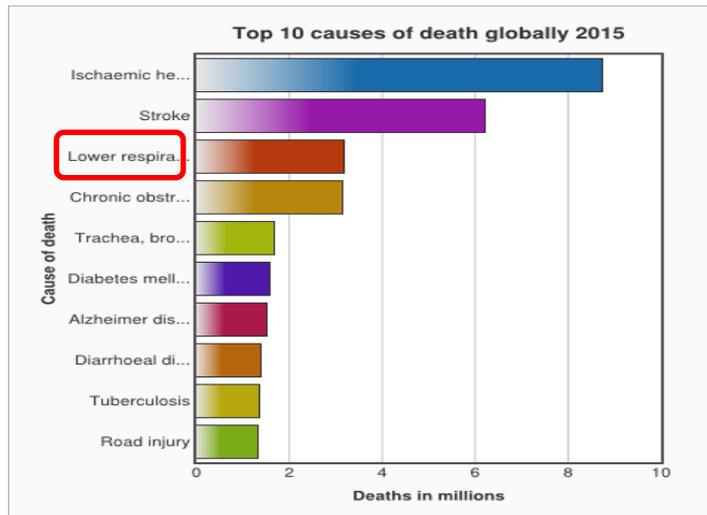
Para la mayoría de los patógenos respiratorios, la colonización nasofaríngea constituye el primer requisito necesario para eventualmente generar una infección local o para diseminarse al tracto respiratorio bajo. Es por esto que uno de los principales roles de la microbiota residente es ofrecer resistencia frente a esa colonización y así asegurar la salud respiratoria. A su vez, dada esta relación simbiótica, es probable que la microbiota respiratoria cumpla un rol clave en la maduración estructural del tracto respiratorio y en la formación de la inmunidad local, tal como ya ha sido descrito en el caso de la microbiota gastrointestinal (Bäumler & Sperandio, 2016; Olszak et al., 2012; Renz, Brandtzaeg, & Hornef, 2012).

La microbiota respiratoria durante la vida temprana es dinámica y su desarrollo se ve afectado por una variedad de factores ambientales y del hospedador, que incluyen el modo de nacimiento, el tipo de alimentación, el tratamiento con antibióticos y las condiciones de hacinamiento, esto es la presencia de hermanos y la asistencia a la guardería. La microbiota respiratoria proporciona señales al sistema inmunitario del hospedero que parecen ser vitales para el entrenamiento inmunológico, la organogénesis y el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria. Cada vez hay más evidencia que respalda que hay un momento en la vida temprana, donde el “senso” o la adecuada elección de la microbiota son esenciales para la maduración inmunológica y la consecuente salud respiratoria (Yuksel & Turkeli, 2017).

### **1.3. Infecciones del tracto respiratorio y su relevancia a nivel mundial.**

Las infecciones del tracto respiratorio (ITR) constituyen un gran problema a nivel mundial ya que son las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo afectando a todos los rangos etarios,

principalmente niños y adultos mayores (Who, 2014). En el año 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó la Alianza Global contra las Enfermedades Respiratorias (GARD) con el objetivo de reunir el conocimiento combinado de organizaciones, instituciones y organismos nacionales e internacionales para mejorar las vidas de más de mil millones de personas afectadas por enfermedades crónicas y enfermedades respiratorias agudas (*Foro de las Sociedades Respiratorias Internacionales El impacto mundial de la Enfermedad Respiratoria*, 2017).



**Figura 1.1. Top 10 de las principales causas de muerte a nivel mundial en el año 2015.**

De las 56.4 millones de muertes en todo el mundo en 2015, más de la mitad (54%) se debieron a 10 causas principales. Las cardiopatías isquémicas y los accidentes cerebrovasculares son las principales causas de muerte en el mundo, con un total de 15 millones de muertes. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica se cobró 3,2 millones de vidas y las infecciones respiratorias (ITR) bajas siguieron siendo la enfermedad transmisible más mortal, causando 3.2 millones de muertes (“WHO | The top 10 causes of death,” 2017).

Actualmente, las ITR continúan siendo la enfermedad transmisible más mortal, causando 3.2 millones de muertes en todo el mundo (Figura 1.1).

### 1.3.1. Neumonía adquirida en la comunidad

Una de las principales ITR es la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), definida como infección aguda del parénquima pulmonar. Es una de las afecciones más comunes que requieren hospitalización con altas tasas de morbilidad, mortalidad y elevados costos en lo que refiere a la atención de la salud del paciente (Kollef & Betthausen, 2019). La organización mundial de la salud (OMS) calcula que en el año 2015 la neumonía mató aproximadamente a 1.000.000 de niños menores de 5 años, lo que supone el 15 % de todas las defunciones de niños menores de 5 años en todo el mundo.

Es la infección más común que conduce a sepsis y shock séptico. Los pacientes con NAC también tienen con frecuencia afecciones co-mórbidas, como insuficiencia cardíaca y diabetes, que no solo predisponen a la enfermedad sino que también influyen en los resultados de los pacientes

hospitalizados con NAC (S. Neill & Dean, 2019). Estos factores señalados anteriormente resaltan la importancia clínica de la NAC y la necesidad de contar con antibióticos efectivos para su tratamiento.

### 1.3.2. Etiología de la NAC

Diversos agentes infecciosos son los responsables de la neumonía adquirida pero el principal patógeno bacteriano causante de la NAC a nivel global es *Streptococcus pneumoniae*. Seguido por otros como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, siendo estos tres últimos los aislados en menor proporción. Dentro de los virus, los más relevantes son *Virus Respiratorio Sincitial* e *Influenza* (Edin et al., 2015; Paukner, Gelone, Arends, Flamm, & Sader, 2019).

### 1.4. *S. pneumoniae*: cuarto patógeno más frecuente de infección mortal.

En el 2017, la Organización Mundial de la Salud, incluyó a *Streptococcus pneumoniae* dentro de los 12 patógenos prioritarios a nivel mundial. Es el cuarto patógeno más frecuente causante de infecciones microbianas mortales (Abuka, 2017; Carapetis, Steer, Mulholland, & Weber, 2005; World Health Organization, 2014).

*Streptococcus pneumoniae*, o neumococo, es una bacteria extracelular, oportunista, gram-positiva, que tiene un rol preponderante en la causalidad de las infecciones respiratorias prevalentes de la comunidad: es el patógeno aislado con mayor frecuencia en infecciones focales, como otitis media aguda y sinusitis y el más frecuentemente relacionado con las infecciones invasivas como neumonía bacteriana y meningitis, en niños menores de 5 años (Washington, Sanitaria, & Internacionales, 2011). Las infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*, constituyen un serio problema de salud pública en países en desarrollo debido a las elevadas tasas de morbi-mortalidad que presentan. Se estima que, anualmente y sólo en Latinoamérica, neumococo es responsable de 1.3 millones de infecciones agudas del oído que pueden derivar en sordera, 327.000 casos de neumonía, 1.229 casos de sepsis y 4.000 casos de meningitis. Mientras que a nivel mundial mueren 1 millón de niños a causa de NAC (Kuipers et al., 2017; Washington et al., 2011).

Los grupos de riesgo para las enfermedades neumocócicas incluyen niños menores de 5 años, personas adultas mayores de 65 años y personas inmunocomprometidas, específicamente aquellas que poseen defectos en sus linfocitos B, deficiencias en el sistema de complemento, esplenectomía o mal

funcionamiento del bazo, defectos en el receptor de interleuquina-1 o pacientes con HIV (D Bogaert et al, 2010)

Por otro lado, otro problema que ha complicado el manejo de las infecciones neumocócicas es el incremento de la resistencia de *S. pneumoniae* a la penicilina y otros antibióticos. Las crecientes amenazas para la salud y económicas de la resistencia a los antibióticos hace que se promueva la prescripción juiciosa de antibióticos, que abarca tanto la reducción del sobreuso como la garantía de prescripción de los agentes adecuados, una prioridad urgente para la salud pública y la seguridad del paciente (Paukner et al., 2019). Es por este motivo que existen muchos grupos de investigación dedicados a determinar la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *S. pneumoniae* y por ende generar fármacos eficaces contra este patógeno.

### 1.4.1. Vacunas anti-neumocócicas

Uno de los factores de virulencia más importantes de este patógeno es su cápsula polisacáridica. La diversidad en su composición polisacáridica permite la diferenciación de esta única especie en 94 serotipos (Bogaert et al, 2009). Sin embargo, un número relativamente limitado de serotipos (15 a 20) son los causantes de la mayoría de las infecciones neumocócicas.

En la actualidad existen dos vacunas comercialmente disponibles contra neumococo, la vacuna polisacáridica 23-valente y la vacuna conjugada 13-valente (PCV-13).

La vacuna 23-valente incluye polisacáridos purificados de 23 serotipos distintos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10, 11, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19, 19F, 20, 22F, 23F y 33F). Esta vacuna protege contra la enfermedad neumocócica invasiva en adultos pero no previene la colonización del tracto nasofaríngeo ni genera inmunidad protectora duradera en niños menores de 2 años o en pacientes inmunocomprometidos (Bjarnarson et al., 2005; Käyhty et al., 2006; van der Poll & Opal, 2009). La necesidad de superar las limitaciones de la vacuna 23-valente condujo al desarrollo de las vacunas neumocócicas conjugadas, en las que los polisacáridos capsulares son conjugados covalentemente a una proteína carrier. La unión covalente del antígeno polisacáridico (T-independiente) al carrier induce una mayor inmunogenicidad y le confiere carácter T-dependiente. Inicialmente se desarrolló y aplicó una vacuna conjugada heptavalente, conteniendo los antígenos capsulares de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19C y 23F. Más adelante, se desarrolló la vacuna conjugada 10- y 13-valente, siendo esta última la que se utiliza actualmente, y que agrega los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A (Quian, 2010). Al presentar los antígenos capsulares al sistema inmune de una manera más inmunogénica, se ha visto que la PCV-7 genera protección contra la infección sistémica y previene la colonización nasofaríngea reduciendo la transmisión en la comunidad (Käyhty et al., 2006; van der Poll & Opal, 2009).

La entrada de las vacunas conjugadas neumocócicas en el calendario vacunal de Uruguay (7 valente en 2008 y 13 valente en 2010) determinó cambios en la epidemiología de las infecciones por neumococo, con reducción de la mortalidad y la morbilidad en niños menores de 5 años de edad. La vigilancia de los neumococos que colonizan la nasofaringe de niños permite reconocer cambios en la frecuencia de serotipos, la persistencia de algunos o la sustitución por otros, así como medir el impacto del sistema de vacunación. En Uruguay se llevó a cabo un estudio en combinación con centros médicos de Paysandú y el Centro Hospitalario Pereira Rossell, que mostró, en niños menores de 2 años, una reducción en la portación nasofaríngea, de los serotipos incluidos en la vacuna conjugada pero a la vez mostró la presencia de serotipos nuevos como el 11A o el 23B, lo que resalta la necesidad de mantener la vigilancia epidemiológica (Camou, 2018).

A pesar del avance que representan estas vacunas en la profilaxis contra neumococo, en la actualidad ninguna de ellas representa una solución definitiva para la prevención de la enfermedad neumocócica. Por tanto, la búsqueda de nuevas vacunas contra *S. pneumoniae* es todavía una prioridad a nivel mundial.

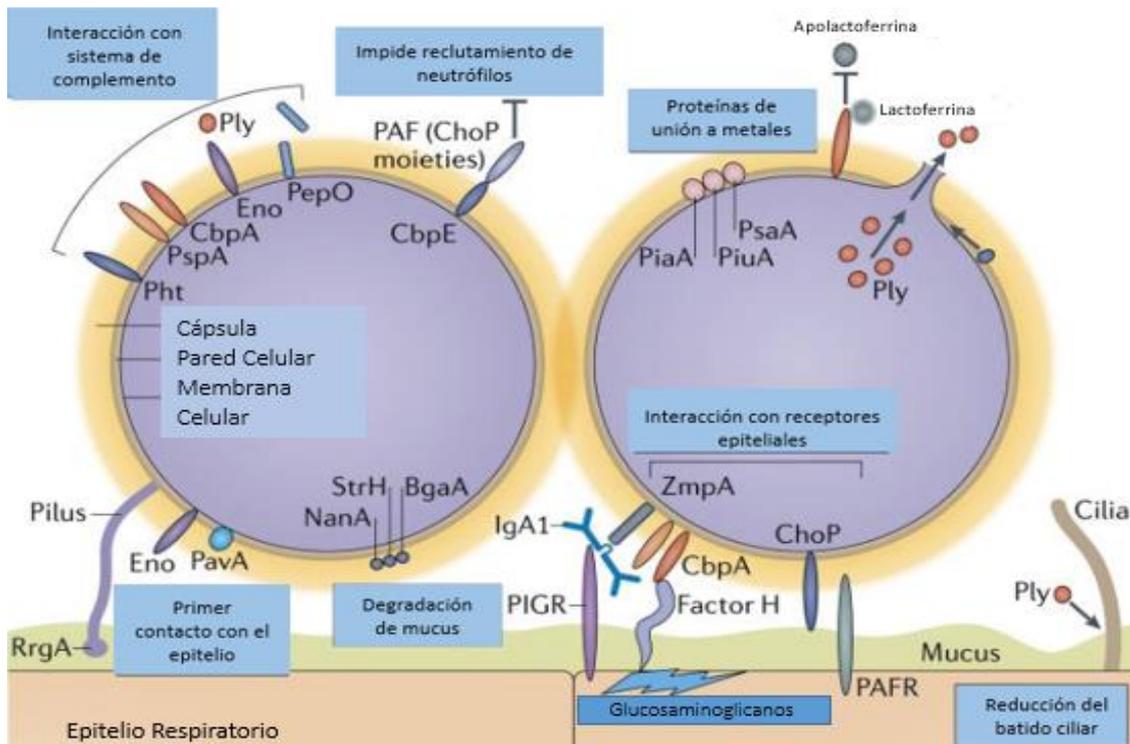
### 1.4.2. Factores de virulencia

Como mencionamos anteriormente el principal factor de virulencia de neumococo es su cápsula polisacáridica. La composición química de la misma junto con la cantidad de polisacárido capsular producido, determinan que se trate de un serotipo más o menos virulento así como la supervivencia de la bacteria en la circulación y las posibilidades de ocasionar enfermedad invasiva (Engholm, Kilian, Goodsell, Andersen, & Kjærsgaard, 2017).

Su cápsula inhibe la acción del complemento, lo protege de la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos. Por otro lado, la cápsula es esencial para la colonización, debido a que impide la remoción de las bacterias mediante el mucus, restringe la autólisis y reduce la exposición a los antibióticos. La capa por debajo de la cápsula polisacáridica es la pared celular y consiste en una estructura rígida que rodea la membrana citoplasmática y que está constituida por peptidoglicanos a los que se unen proteínas, hidratos de carbono y lipoproteínas (Hyams et al., 2010). El peptidoglicano tiene acción antigénica. Asociados a éste se encuentran los ácidos lipoteicoicos que emergen a la superficie y actúan como mediadores de la adherencia a las células epiteliales de la mucosa. En la pared celular también se encuentran los determinantes antigénicos de grupo, como por ejemplo el polisacárido C (Ps-C). Este carbohidrato es el mayor componente estructural de la pared celular de todos los neumococos. Es un polímero de ácido teicoico que contiene fosforilcolina como determinante antigénico mayoritario, siendo ésta la responsable de la interacción de neumococo con la proteína C reactiva. La unión de la

proteína C reactiva al polisacárido C, activa el complemento y media la fagocitosis (D Bogaert, Groot, & Hermans, 2004a).

Además de su cápsula y pared celular, neumococo también cuenta con otros importantes factores de virulencia que están constituidos por diversas proteínas. A continuación se describen algunos de los más destacados, una lista más completa se presenta en la *Tabla 1*.



**Figura 1.2. Esquema de distribución de factores de virulencia en *S. pneumoniae*.**

Las funciones que permiten la colonización por *Streptococcus pneumoniae* son: establecer el primer contacto con el epitelio y los receptores epiteliales, la interacción con el sistema de complemento, degradación del mucus, unión de metales, impedimento de la actividad de los neutrófilos y los efectos proinflamatorios de la toxina neumolisina (Ply). Las enzimas neumocócicas Neuraminidasa A (NanA),  $\beta$ -galactosidasa (BgaA) y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (StrH) degradan el mucus. A su vez, LytA (autolisina) facilita la liberación de Ply, daña el epitelio y reduce el batido ciliar. El polisacárido capsular (CPS) cargado negativamente inhibe la captación de la bacteria por el mucus. CPS y varias proteínas neumocócicas, incluida la proteína de superficie neumocócica A (PspA), la proteína de unión a colina A (CbpA), enolasa (Eno) y la proteína Pht, directa e indirectamente, bloquean la deposición del complemento. PspA también se une a la lactoferrina para adquirir hierro y bloquea el efecto antimicrobiano de la apolactoferrina. La endopeptidasa (PepO), que se libera de la superficie neumocócica, se une a C1q por lo tanto agota los componentes del complemento. La CbpE perjudica el reclutamiento de neutrófilos al degradar el factor activador de plaquetas (PAF), un agente inflamatorio derivado del hospedero. Las interacciones de CbpA con el factor H facilitan la adherencia y la posterior internalización de *S. pneumoniae* a través de glicosaminoglicanos celulares. CbpA también se une al receptor de inmunoglobulina polimérica (PIGR) para promover la adherencia. La metaloproteasa de zinc ZmpA (también conocida como inmunoglobulina A1 proteasa) cliva IgA1, dejándola inactiva. La fosforilcolina (ChoP) permite la unión a su receptor. Las cepas que poseen Pili expresan una adhesina llamada RrgA. Otras adhesinas de *S. pneumoniae* son la enolasa (Eno) y la proteína de adherencia y virulencia A (PavA). PAFR, receptor del factor activador de plaquetas. Tomado de (Weiser, Ferreira, & Paton, 2018).

La neumolisina (Ply), es una proteína intracelular que cuando se libera es capaz de formar poros de 30 nm al unirse al colesterol presente en la membrana celular del hospedero. Esto resulta de gran importancia para el hospedero ya que promueve la inflamación. Por otra parte se ha estudiado que aumenta la supervivencia bacteriana después de la salida del hospedero y es necesaria para la transmisión (Zafar, Wang, Hamaguchi, & Weiser, 2017).

Otro set de proteínas importantes son las proteínas de superficie de unión a colina, PspA y PspC (del inglés: *Pneumococcal Surface Protein A y C*, respectivamente). La primera inhibe la activación del complemento durante la etapa temprana de la infección, permite a neumococo evadir los mecanismos de defensa del hospedero encargados de su eliminación. Ha sido blanco en la formulación de vacunas contra neumococo (Ferreira et al., 2010). Por otra parte, PspC promueve la adherencia y translocación de neumococo a través del epitelio respiratorio al unirse al receptor polimérico de las inmunoglobulinas (plgR). Otra función importante de esta proteína es la interacción con el factor H, el cual es un regulador negativo de la vía alterna del complemento y por ende evita la opsonofagocitosis mediada por complemento (Hyams et al., 2010).

La autolisina (LytA), es otro factor de virulencia importante ya que su función es hidrolizar el peptidoglicano a péptidos y residuos de glicano y de esta forma lleva a la lisis de neumococo liberando todo el contenido intracelular entre ellos neumolisina. Adicionalmente, neumococo expresa una serie de proteínas líticas que degradan la matriz extracelular, glicolípidos y oligosacáridos del hospedero entre ellas hialuronidasas (HylA), neuraminidasas (NanA, NanB, NanC) y serinproteasas (Prta) (D Bogaert et al., 2004a; Kietzman, Gao, Mann, Myers, & Tuomanen, 2016).

Una lista más completa sobre los factores de virulencia se presenta en la *Tabla 1*.

### **1.4.3. Transmisión de neumococo entre hospederos**

La transmisión entre hospederos es un paso clave para la infección con neumococo. Hasta hace un tiempo se creía que la transmisión de neumococo entre personas dependía únicamente del contacto entre una persona portadora asintomática, sobre todo niños pequeños, menores de 5 años, y un hospedero sano mediante el contacto directo con las secreciones nasales o superficies contaminadas (Zafar et al., 2017). También la presencia de infecciones virales favorece esta transmisión de neumococo al colaborar con el estado inflamatorio y la presencia de secreciones abundantes (Vu et al., 2011). En el 2010, se demostró en un modelo murino de co-infección con Influenza que la transmisión no tiene por qué ser exclusivamente al entrar en contacto con las secreciones sino que al ser expulsado desde un hospedero colonizado, neumococo puede sobrevivir en el ambiente hasta tomar contacto con un nuevo hospedero (McCullers et al., 2010). En este último caso, la neumolisina juega un rol esencial en su supervivencia en un ambiente bajo condiciones críticas de nutrientes. Esto se puede

explicar debido al poder inflamatorio que tiene esta proteína y que por ende provoca un aumento de nutrientes en las secreciones nasales donde va contenido neumococo. A su vez, la formación de biofilms por esta bacteria le ayuda a sobrevivir por días con un requerimiento mínimo de nutrientes. Finalmente, la posibilidad de colonizar o sobrevivir en un nuevo hospedero va a depender de si este fue previamente colonizado por la misma u otra cepa de neumococo, ya que en un primer contacto con la bacteria se genera una memoria inmunológica capaz de proteger frente a una colonización subsecuente (Basset et al., 2007; Lu et al, 2009).

**Tabla 1.** Principales factores de virulencia involucrados en la patogenicidad de *S. pneumoniae* (van der Poll & Opal, 2009).

Mecanismo de acción	
Cápsula	Impide eliminación de la mucosa, actividad antifagocítica, impedimento estérico del complemento y de la unión de inmunoglobulinas a receptores del hospedero
Pili	En la superficie celular impide fagocitosis y promueve la invasión
Ácido teicoico	Se une al receptor del factor activador de plaquetas (PAFr), ligando de TLR-2 y actividad proinflamatoria
Fosforilcolina	La fosforilcolina presente en la pared celular interactúa con PAFr y permite la translocación de neumococo a través del epitelio
Transportadores ABC	Implicados en la virulencia del neumococo, Ami y PIP(Ali) son transportadores de oligopéptidos (involucrados en competencia)
Proteínas CBPs	
LytA	N-acetilmuramil-L-alaninaamidasa. Principal autolisina
LytB	N-acetilglucosaminidasa.
LytC	Lisozima. Autolisina a 30°C
Pce	Fosforilcolinesterasa. Hidrolasa de pared celular. Se une a plasminógeno
PspC	Se une al receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR) en las células epiteliales
PspA	Recientemente se demostró que se une a la cadherina E en las células epiteliales
Proteínas LPTXG	
NanA	Neuraminidasa
Proteasa IgA1	Inactiva la IgA1 humana y media el incremento de adhesión del neumococo al epitelio
Lipoproteínas	
Psa A	Lipoproteína transportadora de manganeso. Se une a cadherina E
PiuA/PiA	Componentes lipoproteicos de transportadores ABC, adquieren hierro para crecimiento bacteriano y virulencia
Otras proteínas	
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Se une a plasminógeno
PavA	Se une a la fibronectina y esto favorece la unión a las células del hospedero
Eno	Se une al plasminógeno y esto favorece la unión a las células del hospedero
Neumolisina	Citólisis, ligando de TLR-4, induce ciliostasis, impide estallido respiratorio, activación de complemento y producción de citoquinas y quimioquinas.

## 1.5. Colonización Nasofaríngea

La colonización nasofaríngea es un proceso dinámico en cuanto a la rotación de serotipos y especies colonizantes. Neumococo forma parte de la microbiota comensal del tracto respiratorio superior. Junto con *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* y varios estreptococos hemolíticos, colonizan el nicho nasofaríngeo. La portación de neumococo en nasofaringe comienza dentro de los seis meses de vida y su colonización permanece durante la niñez (Das et al., 2014a). En los niños, neumococo tiene una prevalencia de 30 a 60%, mientras que en adultos es de 1- 10%. En algunos estudios se ha mostrado que más del 95% de los niños pueden haber sido colonizados por 6 serotipos distintos a la edad de dos años pero a medida que crecen, la prevalencia de la portación disminuye y la distribución de los serotipos colonizantes varía, pudiéndose encontrar incluso algunos de los serotipos prevalentes en adultos. Antes de los 9 años, la colonización se mantiene por encima del 30 al 40%, pero luego disminuye progresivamente (Song, Nahm, & Moseley, 2013).

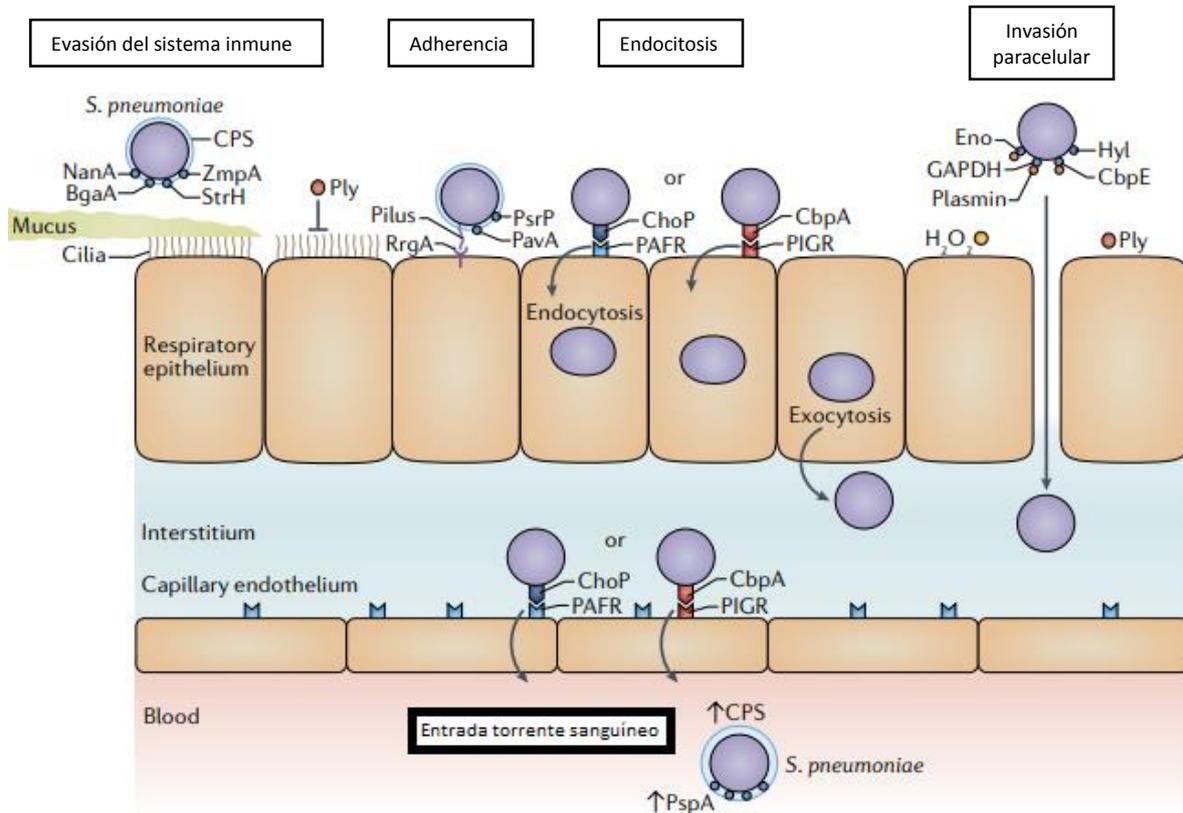
### 1.5.1. Establecimiento de la colonización nasofaríngea por neumococo

La portación de neumococo en nasofaringe puede durar desde semanas hasta meses. Dependiendo del serotipo colonizante, la portación en nasofaringe podrá ser asintomática y pasajera o podrá derivar en una enfermedad invasiva. Como se mencionó anteriormente, neumococo cuenta con diversos factores de virulencia que le permiten superar las barreras naturales que presenta el hospedero. A su vez, el hospedero cuenta con una variedad de mecanismos para evitar que esto suceda.

Por un lado, el mucus y el batido del sistema mucociliar tienen la función de eliminarlo a través de las secreciones nasales. Sin embargo, la cápsula polisacáridica de neumococo le permite evadir esta acción del mucus, dado que su carga negativa repele a los mucopolisacáridos ricos en ácido siálico del mucus (Weiser et al., 2018). Por otra parte, mediante la modulación de la expresión de cápsula, neumococo puede proteger o exponer, sus proteínas de superficie, importantes en la adherencia a la superficie epitelial del hospedero, entre otras funciones (Hammerschmidt et al., 2005).

Otra barrera a la que se enfrenta esta bacteria cuando ingresa a la nasofaringe es la microbiota residente, con quien podrá interactuar de manera cooperativa o competitiva. El balance entre la microbiota residente y las distintas especies invasoras transitorias es importante. Ghaffar y sus colaboradores demostraron que la microbiota residente, incluidos los estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos, inhiben la colonización por neumococo así como también por otros patógenos respiratorios como *H. influenzae*, *S. aureus* y *M. catarrhalis*. El equilibrio competitivo entre estas especies puede ser alterado por el uso de antibióticos (D Bogaert et al., 2004b; F Ghaffar et al, 1999). Por otro lado, existe colaboración interespecie, como por ejemplo la que se da entre neumococo y el virus de la Influenza A

(VIA). El ambiente inflamatorio creado por el organismo en respuesta a la infección por VIA, favorece la colonización e incluso la invasión por parte de neumococo, ya que lo provee de nutrientes y aumenta la expresión de los receptores epiteliales que neumococo necesita para adherirse e invadir (Avadhanula et al., 2006; Mina, McCullers, & Klugman, 2014).



**Figura 1.3. Esquema de la invasión de *S. pneumoniae* en el epitelio del hospedero.**

Se requieren varios pasos para la invasión del tracto respiratorio. Neumococo evade el ser atrapado por el mucus y eliminado por el batido mucociliar. Esto es debido a su polisacárido capsular cargado negativamente y a la degradación proteolítica de la inmunoglobulina A1 secretora (IgA1) por la metaloproteasa de zinc ZmpA. La neuraminidasa A (NanA), la  $\beta$ -galactosidasa (BgaA) y la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (StrH) desglicosilan el mucus y exponen los motivos glicanos del epitelio para sus adhesinas. Finalmente, la neumolisina (Ply) inhibe el batido ciliar. La adherencia a la superficie apical de las células epiteliales está mediada por diversas estructuras superficiales, que incluyen la fosforilcolina (ChoP), la proteína A de unión a colina (CbpA), la subunidad pili auxiliar RrgA en la punta de los pili, la proteína A de adhesión y virulencia (PavA) y glicoproteína grande expuesta a la superficie (PsrP). *S. pneumoniae* se une a través de ChoP al receptor del factor activador de plaquetas (PAFR) y a través de CbpA al receptor de inmunoglobulina polimérica (PIGR) e induce su propia endocitosis, que es seguida por la liberación de neumococo hacia la superficie basolateral. Alternativamente, Ply y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) dañan directamente el epitelio y la hialuronatoliasa (Hyl) y la plasmina, que se unen a la superficie neumocócica a través de enolasa, CbpE, degradan la matriz extracelular. Esto rompe la barrera epitelial y proporciona un camino para la invasión paracelular. Las interacciones ChoP – PAFR y CbpA – PIGR también permiten que neumococo atraviese el endotelio y entre en el torrente sanguíneo. La regulación positiva de PAFR por citoquinas inflamatorias amplifica la invasión mediada por ChoP-PAFR. La CPS y otros factores de virulencia, como la proteína de superficie neumocócica A (PspA), CbpA y Ply, facilitan la evasión de opsonofagocitosis.

La vacunación genera un desequilibrio sobre este tipo de relaciones de competencia, cooperatividad e inhibición entre las distintas cepas de una misma especie e interespecie, y puede generar

consecuencias graves e impredecibles en la composición de la microbiota nasofaríngea (D Bogaert et al., 2004b; Charalambous & Leung, 2012)

### 1.5.2. Inmunidad humoral y celular frente a la colonización

La rápida activación de distintos componentes del sistema inmune innato del hospedero frente a la colonización por neumococo ayuda a iniciar una respuesta inmediata con el fin de evitar que neumococo se multiplique y disemine hacia otros tejidos.

Por un lado, IgA es la inmunoglobulina más predominante en las mucosas, constituyendo más de un 90% de las inmunoglobulinas en las vías respiratorias. Reconoce al polisacárido capsular de neumococo (PnPS) como antígeno lo que la hace la inmunoglobulina más relevante en la respuesta humoral contra esta bacteria en niños menores de 5 años que es el grupo de edad con las tasas más altas de colonización y enfermedad neumocócica (Wani, Gilbert, Plaut, & Weiser, 1996). Esta inmunoglobulina tiene la capacidad de bloquear la adhesión de neumococo a la superficie celular y por ende bloquea el primer paso de la colonización que es la adherencia de neumococo al epitelio. Sin embargo, como se mencionó anteriormente neumococo posee una proteasa que cliva la IgA1 humana, dejándola inactiva. Por otra parte, la proteína C reactiva (CRP) es otro componente importante de la inmunidad innata del hospedero. Esta proteína tiene varias funciones debido a su capacidad de unirse a la fosforilcolina que expresa neumococo en su superficie. Por un lado, esta unión induce la activación de la vía clásica del complemento potenciando de esta manera su opsonización. Por otro lado, dicha unión inhibe la adhesión de la bacteria al receptor del factor activador de plaquetas (PAFr) en la superficie de las células del hospedero. De esta manera ayuda a eliminar la colonización del tracto respiratorio alto, evitando que neumococo migre a través de las capas endoteliales y epiteliales en un proceso denominado invasión de tejido pericelular (J M Gould & Weiser, 2001; Jane M Gould & Weiser, 2002).

A su vez, la activación de la inmunidad innata puede lograrse a través de un diverso conjunto de receptores de reconocimiento de patrones, los PRRs. Estos receptores reconocen varios motivos comunes a microorganismos que se han denominado PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), y también patrones asociados al daño endógeno DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*). Los PAMPs son motivos moleculares conservados que se encuentran formando parte de estructuras esenciales para los microorganismos, siendo por ejemplo componentes estructurales de la pared celular, unidades de ensamblaje de los flagelos, parte del material genético, etc. Su función única en el microorganismo hace que la estructura se mantenga relativamente conservada y que no sea afectada de forma importante por las mutaciones. Se conocen cuatro clases de PRRs: los TLRs, que fueron los primeros receptores descritos de este tipo y han sido por tanto los más estudiados, los receptores citoplasmáticos NLR de "*Nucleotide binding oligomerization domain (NOD) Like Receptors*",

los receptores transmembrana de tipo lectina C o CLR y los receptores RLR, de “*Retinoic acid inducible gene (RIG) I Like Receptors*”, constituidos por helicasas de ARN localizadas en el citoplasma, que se especializan en el reconocimiento de virus (Koppe, Suttorp, & Opitz, 2012).

La señalización a través de los receptores tipo Toll activa la respuesta innata de las mucosas que finaliza en el reclutamiento de fagocitos como neutrófilos y macrófagos (Craig, Mai, Cai, & Jeyaseelan, 2009). El adaptador mejor caracterizado por su participación en la señalización de la mayoría de los TLRs es MyD88. A partir del mismo se activan las cuatro vías principales de señalización: la vía del factor nuclear de transcripción  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) y tres vías de protein-quinasas activadas por mitógeno (MAP quinasas) (Díaz et al. 2009). Los ratones deficientes en MyD88 son incapaces de controlar el crecimiento de patógenos respiratorios como *S. pneumoniae* (Albiger et al., 2005). TLR2, TLR4 y TLR9, así como también la proteína adaptadora MyD88, participan en la detección temprana y posterior eliminación de neumococo en los pulmones (Muñoz et al., 2010). Se ha demostrado que animales deficientes en TLR2, el cual reconoce el ácido lipoteicoico o las lipoproteínas neumocócicas, presentan un retraso en la eliminación de la carga bacteriana (van Rossum, Lysenko, & Weiser, 2005). Por otra parte, TLR9 detecta ADN bacteriano (motivos CpG no metilados) y resulta esencial para la fagocitosis y destrucción eficaz de neumococo por los macrófagos pulmonares (Albiger et al., 2007). Por otra parte, TLR4 se activa en presencia de neumolisina. Estudios *in vivo* con ratones deficientes en TLR4 (*Tlr4<sup>-/-</sup>*) han mostrado una mayor susceptibilidad, y por ende mayor carga bacteriana y un aumento en la apoptosis de las células del tracto respiratorio alto a tiempos tempranos durante la colonización y luego de la infección pulmonar por neumococo, en dosis bajas (Malley et al., 2003; Branger et al., 2004; Srivastava et al., 2005).

Otros PRRs como los receptores MARCO (del inglés: *macrophage receptor with collagenous structure*) y CD14 también juegan un rol importante en el reconocimiento de este patógeno. Dorrington y colaboradores demostraron que el reconocimiento de la bacteria por el receptor fagocítico MARCO es necesario para la óptima señalización de TLR2 y NOD2. MARCO sirve como co-receptor para CD14/TLR2 así como también como un receptor fagocítico que expone al neumococo y a sus antígenos al fagolisosoma o en última instancia al receptor NOD2 ubicado en el citosol (Dorrington et al., 2013).

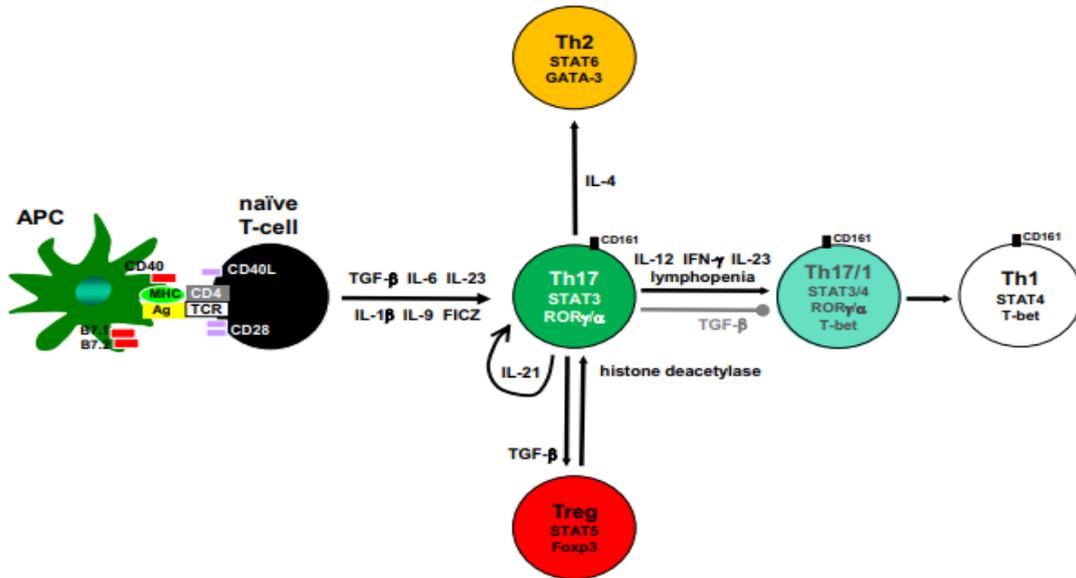
Tanto el sistema del complemento, como las inmunoglobulinas, IgA, IgM e IgG y la detección de la presencia de neumococo por receptores de tipo Toll, hacen posible que a las 24h del ingreso de neumococo en nasofaringe comience un influjo de neutrófilos hacia el sitio de infección con el fin de reducir la carga bacteriana mediante muerte por opsonofagocitosis y generación de NETS (del inglés: *Neutrophil Extracellular traps*, NETs). Las NETs son mallas o trampas de ADN que encierran histonas y proteínas antimicrobianas, atrapando y eliminando así a neumococo. La columna vertebral estructural de las NETs es el ADN, y se degrada rápidamente en presencia de DNasas. Por lo tanto, las bacterias que expresan DNasas, como es el caso de neumococo, son más virulentas (Brinkmann et al, 2010;

Kadioglu et al, 2008b). Sin embargo, algunos autores han sugerido que ni la respuesta humoral (McCool & Weiser, 2004) ni la rápida acción de los neutrófilos (Z. Zhang et al, 2009) es suficiente para eliminar la carga bacteriana. En este sentido, un tipo celular que ha recobrado relevancia en los últimos años a la hora de combatir a neumococo es el macrófago. En 2014 Weisser y sus colaboradores demostraron, en un modelo murino, un retraso en la eliminación de neumococo de nasofaringe en animales que producían cantidades insuficientes de CCL2, y que por tanto no reclutaban de manera óptima macrófagos al sitio de infección. Esta diferencia la vieron entre ratones jóvenes y ratones adultos, siendo los ratones jóvenes los que producían niveles bajos de CCL2 (Siegel, Tamashiro, & Weiser, 2015a). El reclutamiento de macrófagos sería dependiente por un lado de células Th17 y por el otro de la expresión y el sensado de la citoquina quimioatrayente CCL2 (o MCP-1) (Lemon, Miller, & Weiser, 2015a). La producción de esta quimioquina y el reclutamiento de macrófagos se deben al reconocimiento de determinados componentes de neumococo a través de TLR2 y Nod2, así como también al receptor MARCO de los macrófagos (Dorrington et al., 2013). A su vez, Weisser apoya la hipótesis de que efectivamente sean los macrófagos la primera línea de defensa contra neumococo. Su trabajo muestra que aquellos ratones deficientes en MIF (del inglés: *Macrophage Migration Inhibitory Factor*), a los cuales inoculan vía intranasal con los serotipos 6B (virulento) y 23F (no virulento) de neumococo, muestran una colonización nasofaríngea más prolongada que los animales WT. Por otro lado, también observaron que la expresión de la quimioquina CCL2 se veía reducida en los animales *mif*<sup>-/-</sup> (Das et al., 2014a).

Por otra parte, en los últimos años ha surgido evidencia considerable sobre el rol esencial que juega la respuesta celular, llegando a postularse que la protección contra la colonización es dependiente de células TCD4<sup>+</sup> (Malley et al., 2005). Malley y colaboradores demostraron que animales deficientes en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y que por tanto no tienen células TCD4<sup>+</sup> funcionales, presentan una colonización más prolongada (Malley et al., 2005). Esto sugiere un rol de estas células en la protección frente a la colonización. Por otro lado, la transferencia adoptiva de células TCD4<sup>+</sup> específicas confirió protección a animales RAG-deficientes (que no tienen células T ni B) (Lu et al., 2008). En particular, se ha visto que las células TCD4<sup>+</sup> productoras de IL-17A, (Th17) son el subtipo responsable de la protección frente a la colonización por neumococo (Malley et al., 2005; Roche, King, & Weiser, 2007). A su vez, otros trabajos establecen que la colonización nasofaríngea por neumococo se mantiene en el tiempo debido a que se aumenta la expresión de TGF- $\beta$ 1 el cual tiene un rol esencial en la inmunosupresión de la inmunidad innata y adaptativa. Coincidentemente con esto, en este mismo trabajo se observa una mayor presencia de células T reguladoras (Treg) en aquellos animales que no pueden eliminar la colonización (D. R. Neill et al., 2014a).

### 1.5.3. Células Th17, productoras de IL-17A y su rol durante la colonización nasofaríngea por neumococo

La diferenciación de las células Th17 está coordinada por factores de transcripción específicos de linaje. Es así que la citoquina TGF- $\beta$  conduce a la diferenciación de las células Treg mediante la inducción de Foxp3 (Barbi, Pardoll, & Pan, 2013). Por otra parte, IL-6 previene la inducción de Foxp3 por TGF- $\beta$  y en cambio, dirige la diferenciación de las células T hacia el linaje Th17 mediante la inducción de *rorc* y *rora*, que codifican para ROR $\gamma$ t y ROR $\alpha$ , respectivamente. Este mecanismo por el cual IL-6 induce la diferenciación de las células Th17 involucra la activación de Stat3 y la producción de IL-21 por las células T. Por otra parte, TGF- $\beta$  apoya indirectamente la polarización hacia Th17 ya que evita o inhibe la diferenciación de las células T hacia los perfiles Th1 o Th2. El perfil transcripcional de las células Th17 diferenciadas bajo la inducción de IL-6 y TGF $\beta$  es muy distinto al que se obtiene cuando las células Th17 se diferencian en presencia de IL6 e IL23. Ghoreschi y colaboradores compararon ambos perfiles transcripcionales y encontraron más de 2000 genes expresados diferencialmente. Por ejemplo, las células Th17 inducidas a partir de IL-6 y TGF $\beta$  expresaron niveles más altos de Tbx21, Il18r1, Cxcr3 e Il33, mientras que las células Th17 diferenciadas en presencia de IL-6 e IL-23 expresaron niveles más altos de Il9, Il10 y Ccl20 (Ghoreschi et al., 2010). A su vez, IL-23 también puede promover directamente la diferenciación de Th17 al aumentar la expresión de *rorc* en combinación con IL-1 $\beta$  e IL-6 (Figura 1.4). IL-23 a su vez ayuda a la maduración y el mantenimiento del linaje Th17. La diferenciación de Th17 bajo la presencia de IL-1 $\beta$  tiene un impacto positivo en el manejo de la inflamación ya que promueve la expresión de una multitud de factores endógenos y exógenos que estimulan la actividad del inflammasoma. Por lo que estos datos sugieren que según el perfil transcripcional de las células Th17 se puede identificar qué citoquinas dirigieron su diferenciación. Cada uno de estos subtipos de Th17 va a diferir en su capacidad para mediar en la enfermedad. Cabe destacar que, aunque TGF- $\beta$  es crucial para el desarrollo del linaje Th17 en ratón, en humanos la diferenciación requiere IL-1, IL-6 y posiblemente IL-23, pero no TGF- $\beta$  (Khader, Gaffen, & Kolls, 2009; Napolitani, Acosta-Rodriguez, Lanzavecchia, & Sallusto, 2009).



**Figura 1.4. Esquema de los factores extracelulares que controlan la plasticidad de las células TH17.**

La diferenciación de las células TCD4 requiere de la presencia del antígeno y de las señales co-estimuladoras derivadas de las células presentadoras de antígeno. La presencia de TGF-β e IL-6 inducen la producción de IL-21 en las células T, que actúa de manera autócrina a través del factor de transcripción STAT3 para mantener el linaje Th17. IL-23 e IL-9 también activan STAT3 para promover la diferenciación de Th17. La transcripción RORγt y RORα estabiliza la expresión de IL-17. IL-23 aumenta la expresión de T-bet e IFN-γ en las células Th17 y ayuda en su maduración y mantenimiento del linaje TH17. Al eliminar TGF-β del entorno, las células Th17 se convierten en Th1, precedidas por una etapa intermedia RORγ<sup>+</sup>/α<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup>. Otras señales que resultan en la conversión de Th1 incluyen IL-12, IFN-γ y linfopenia. Además, las células Th17 son capaces de convertirse en Tregs y viceversa (McAleer & Kolls, 2011).

STAT3 coordina la diferenciación de Th17 mediante la unión a promotores para muchos genes de las células Th17, incluidos *rorc*, *rora*, *Il17a*, *Il17f*, *Il6ra*, *Il21* e *Il23r* (Durant et al., 2010).

Muchos estudios se han centrado en la diferenciación de las células TCD4 naive en subconjuntos efectoras; sin embargo, recientemente, se ha prestado atención a la interconversión entre subconjuntos. El equilibrio entre las células Treg y las células Th17 en el cultivo se controla mediante diversos factores, entre ellos, IL-6, IL-1, IL-23 y ácido retinoico (Bettelli et al., 2006; Lochner et al., 2008). Además, algunas células T CD4 en los sitios de la mucosa co-expresan Foxp3 y RORγt, lo que sugiere que el medio local determina si se inducirán células Treg o Th17 *in vivo*. Las células dendríticas (CD) desempeñan un papel importante en la polarización de las células T, y las CD activadas a través de dendrina-1 son capaces de estimular la producción de IL-17 a partir de células Foxp3/RORγt. Interesantemente, las células Th17 son capaces de convertirse en linajes Th1 o Th2, pero no al revés (Figura 1.4) (Nurieva, Yang, Chung, & Dong, 2009). Por ejemplo, la presencia de IFN-γ y/o IL-12 hará que las células Th17 aumenten la regulación de T-bet y produzca IFN-γ. Se ha sugerido que las células IL-17<sup>+</sup>/IFN-γ<sup>+</sup> derivan de Th17 y pueden ser identificadas por el marcador de superficie CD161 (Nistala et al., 2010). La simple transferencia de células Th17 a hospederos linfopénicos también resultará en su conversión Th1.

Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17A e IL-17F así como también de IL-21 e IL-22 (Khader et al., 2009). Siendo IL-17A la citoquina más relevante de las células Th17 y por tanto la más estudiada ya que desempeña un papel crítico en la defensa del hospedero contra varios patógenos microbianos, así como la inflamación de los tejidos.

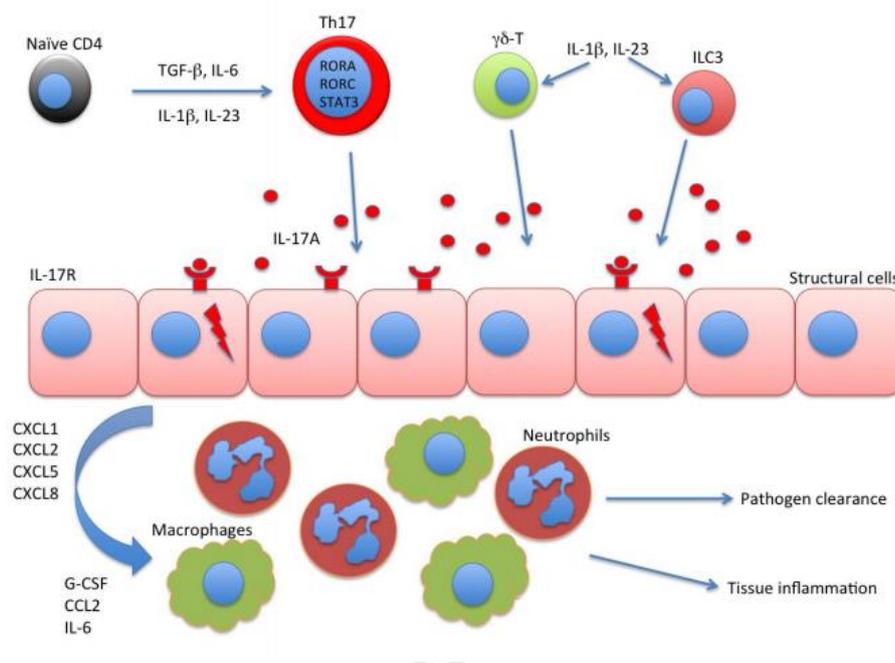
IL-17A puede producirse también por linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, gamma-delta T ( $\gamma\delta$ -T), NKT invariantes, células linfoides innatas de tipo 3 (ILC3) (Cua & Tato, 2010), así como también por neutrófilos y macrófagos bajo determinadas circunstancias (Taylor et al., 2014).

El receptor de IL-17A (IL-17RA) fue el miembro fundador de la familia de receptores IL-17 que incluye IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. IL-17RA parece ser una cadena de receptores comunes compartida con otros miembros de la familia IL-17R. Por ejemplo, IL17RA se empareja con IL-17RC para permitir la unión y señalización de IL-17A e IL-17F (Gaffen et al, 2009). Estas dos citoquinas son las que presentan mayor homología dentro de la familia, siendo probablemente esta la razón por la cual usan mecanismos de señalización similares para ejercer sus funciones pro-inflamatorias (Chang & Dong, 2009; Hymowitz et al., 2001). Ishigame y colaboradores estudiaron los diferentes roles que ejercen estas dos citoquinas frente a infecciones bacterianas en las mucosas respiratorias y en la respuesta frente a alergias y enfermedades autoinmunes (Ishigame et al., 2009). Fue así que demostraron que en estas últimas, IL-17F tiene una menor actividad, en comparación con IL-17A, en las respuestas inmunitarias pese a que ambas se unan al mismo receptor de membrana. En este sentido, encontraron que IL17F presenta una menor capacidad de inducir la producción de citoquinas por parte de los macrófagos o de células T, que IL-17A, ya que esta última mejora las respuestas inmunitarias activando el “priming” de las células T, y promoviendo la inflamación al inducir la producción de citoquinas por diversos tipos de células, incluidos los macrófagos (Da Silva et al., 2008) y las células dendríticas (Cory et al., 2008). Esta baja actividad inductora de citoquinas de IL-17F en las células inmunes puede ser responsable de la ineficiencia de esta citoquina en las respuestas alérgicas y enfermedades autoinmunes. Sin embargo, en este trabajo también se demostró como ambas citoquinas, IL17A e IL17F, son de igual manera importantes frente a una infección por *S. aureus* y que inclusive frente a una infección con *C. rodentium*, a nivel del colon, IL17F es tan importante o más que la actividad de IL17A.

Con respecto a la protección o eliminación de la colonización por neumococo a nivel de nasofaringe, hay muchos trabajos que hablan de la relevancia de IL17A pero no así de IL17F.

Fue en el año 2006 que Malley y colaboradores vincularon por primera vez la infección por *S. pneumoniae* con IL-17, afirmando que esta última cumplía un rol central a nivel de protección contra colonización (Malley et al, 2006). Este equipo de investigadores comenzó empleando una cepa no capsulada de *S. pneumoniae*, la cual fue inactivada y suministrada vía intranasal con toxina colérica

como adyuvante, para generar una respuesta inmune tanto a nivel local como humoral. Como resultado, obtuvieron una excelente protección contra la colonización así como también contra la sepsis. El mismo resultado fue obtenido tras inocular vía intranasal a los ratones con la misma cepa capsulada o cepas capsuladas heterólogas. Utilizando animales RAG deficientes, mostraron que la vacunación indujo una respuesta de IL-17, y que esta era clave en la protección contra la colonización como quimioatrayente y activadora de neutrófilos (Lu et al, 2008; Zhang et al, 2009). Resultados compatibles con lo dicho anteriormente se obtuvieron en experimentos de inmunización con el polisacárido capsular purificado (Malley et al., 2006) o con la mezcla de proteínas de superficie (Basset et al., 2007; Lu et al., 2009) utilizando toxina cólerica como adyuvante en ambos casos. Recientemente se demostró que IL17A es capaz de generar cambios en la composición del microbioma nasal y estos cambios pueden ser un factor importante para el éxito de la resistencia a la colonización neumocócica y podrían ser manipulados para aumentar la defensa del hospedero contra este patógeno (Ritchie, Ijaz, & Evans, 2017).



**Figura 1.5.** Esquema de las vías de señalización que involucran a IL-17A en el curso de una infección. Las células T CD4 vírgenes se diferencian en células T productoras de IL-17 en el entorno de las citoquinas, incluyendo TGF-, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23. La diferenciación de Th17 está controlada por factores de transcripción que incluyen RORA, RORC y STAT3. Las células linfoides innatas de tipo 3 (ILC3) y las células  $\gamma\delta$ -T también pueden producir IL-17 en respuesta a la estimulación de IL-1 $\beta$  e IL-23. IL-17A actúa sobre células estructurales tales como células epiteliales, fibroblastos y queratinocitos en diversos tejidos, incluyendo la piel, el intestino y el pulmón. Las células estructurales que expresan el receptor de IL-17 producen citoquinas inflamatorias como G-CSF e IL-6, así como quimioquinas para atraer neutrófilos y macrófagos a los tejidos inflamados. Estas células inflamatorias pueden eliminar la infección e iniciar una inflamación patógena (Chen & Kolls, 2017)

Desde hace varios años nuestro grupo de investigación ha estado trabajando en investigación y desarrollo en nuevas vacunas e inmunoterapias para el tratamiento de infecciones respiratorias. Se trabajó en la puesta a punto de modelos murinos de neumonía neumocócica subletal y aguda, así

como de colonización, con cepas de *S. pneumoniae* de relevancia clínica. En particular, trabajando con un aislamiento clínico de serotipo 1, se mostró que la infección intranasal de ratones C57BL/6 con una dosis subletal genera una sólida protección frente a un desafío subsecuente con la misma cepa, que se evidencia tanto cuando el desafío se realiza a la semana de la infección subletal como a los dos meses. Análisis de la respuesta transcripcional, por microarreglos de ARN y PCR en tiempo real, mostró que una diferencia fundamental entre los animales protegidos y los animales control, es la regulación positiva de IL-17A, IL-17F e IL-22, en los animales que sobreviven al desafío. Esto sugiere un rol para estas respuestas en la protección contra neumococo (Marqués et al., 2012). Hace unos años que nuestro grupo viene realizando estudios en ratones *Il17a<sup>-/-</sup>* que muestran que a pesar de la asociación mostrada entre IL-17A y la protección contra la neumonía aguda causada por *S. pneumoniae*, esta citoquina no es esencial para la protección, dado que los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* sobreviven al desafío letal. Sin embargo, se encuentran en estudio funciones que puede estar cumpliendo esta citoquina en este modelo.

Por otra parte, en lo que refiere a la colonización por neumococo, como se mencionó más arriba, los datos de la bibliografía sugieren un rol relevante de IL-17A en la protección y es por este motivo que consideramos de interés evaluar la colonización nasofaríngea en los animales deficientes para *Il17a* y su cepa singénica salvaje. Por tanto, el objetivo central de esta tesis es profundizar en la caracterización del perfil humoral, molecular y celular de la respuesta inmune durante la colonización por *Streptococcus pneumoniae* serotipo1 (Pn1), y en especial ahondar en el rol de IL-17A en dicha respuesta. Para ello, trabajaremos con una cepa de ratones deficientes en IL17A (*Il17a<sup>-/-</sup>*). En primer lugar, se estudiará la respuesta humoral, a nivel de anticuerpos de tipo IgM, IgA, IgG y subclases, específica contra el polisacárido capsular o contra el polisacárido C, inducida a nivel sistémico o local, frente a la colonización. En segundo lugar, se caracterizará, a nivel transcripcional, la respuesta inducida frente a la colonización por neumococo, en tejidos asociados a nasofaringe. Es fundamental analizar y comparar la expresión de los mensajeros de citoquinas pro y anti inflamatorias, péptidos antimicrobianos y factores de transcripción entre la cepa salvaje y la mutada. Una profunda caracterización a este nivel nos permitirá no solo describir cómo responde la cepa salvaje frente a la colonización por neumococo sino también si la ausencia de IL-17A está condicionando la expresión de alguno de estos mensajeros. Por otro lado, tanto los macrófagos como las células T reguladoras han sido descritas como claves en el control de la colonización, por lo que es interesante ver en nuestro modelo si ambas cepas tienen igual reclutamiento de estos tipos celulares.

Este estudio permitirá esclarecer y aportar información sobre los mecanismos que se activan a nivel celular y molecular durante la colonización por neumococo.

## Capítulo 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo General

Profundizar en la caracterización del perfil humoral, molecular y celular de la respuesta inmune durante la colonización por *Streptococcus pneumoniae* serotipo1 (Pn1), y en especial estudiar el rol de IL-17A en esa respuesta.

#### 2.1.1. Objetivos específicos

1. Evaluar la respuesta humoral durante la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* serotipo 1
2. Evaluar el perfil transcripcional, a nivel de nasofaringe, durante la colonización por *S. pneumoniae* serotipo 1, comparando animales salvajes e *Il17a<sup>-/-</sup>*.
3. Identificar las poblaciones de neutrófilos y macrófagos en muestras de lavados nasofaríngeos (NAL) y determinar si existe un reclutamiento diferencial de dichas poblaciones celulares entre ambas cepas luego de la colonización con Pn1.
4. Estudiar las poblaciones de células T reguladoras presentes en tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) de animales WT e *Il17a<sup>-/-</sup>* colonizados por Pn1.
5. Ensayos *in vitro* para la determinación de diferencias en la capacidad bactericida de los macrófagos diferenciados a partir de precursores de médula ósea de ambas cepas.

## Capítulo 3. Materiales y Métodos

### 3.1. Cepas Bacterianas

La cepa de *Streptococcus pneumoniae* utilizada en este trabajo fue provista por la Dra. Teresa Camou del Departamento de Laboratorios del Ministerio de Salud Pública, Uruguay. Consiste en la cepa E1585 de *S. pneumoniae* serotipo 1 (Pn1), caracterizado en dicho laboratorio, que corresponde a un aislado clínico de sangre de un paciente con diagnóstico de neumonía.

#### 3.1.1. Crecimiento y mantenimiento de las cepas

Las bacterias fueron recibidas en placas de agar sangre (Agar Tripticasa Soja (Difco) complementado con 5% de sangre ovina estéril) e inmediatamente se procedió a la preparación de las alícuotas madre de cada una de las cepas. Para esto, 10 tubos conteniendo 10 mL de caldo Todd Hewitt (SIGMA) complementado con 0.5% de extracto de levadura (THYB), fueron inoculados con 10 colonias aisladas de la cepa E1585 de *S. pneumoniae*. Se incubó a 37°C, con agitación, hasta alcanzar una OD a 600 nm de 0.2- 0.4 UA. Luego se realizó un pool con 2 mL de cada uno de los tubos crecidos, al cual se agregó un volumen igual de caldo THYB y glicerol hasta una concentración final de 13%. Dicho pool se dispensó en alícuotas de 1.5 mL que fueron guardadas a -80°C. Se controló la pureza de esta preparación en placas de agar sangre; las colonias de neumococo son umbilicadas y  $\alpha$ -hemolíticas por lo que presentan un halo verde a su alrededor.

Las alícuotas de trabajo se prepararon a partir de una alícuota madre, siguiendo exactamente el mismo procedimiento salvo que los cultivos bacterianos se incubaron hasta obtener una OD a 600nm de 0.7 – 0.9 UA. El pool se alícuotó y se guardó a -80°C. Para estimar la concentración en cada una de las alícuotas de trabajo, se eligieron 3 alícuotas al azar y se realizaron 6 diluciones seriadas a partir de la original. Dichas diluciones se plaquearon en placas de agar sangre. Las mismas se incubaron a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>, por 18 h. Luego se realizó el recuento del número de unidades formadoras de colonia (ufc) y de allí se estimó el número de ufc/mL en las alícuotas de trabajo. En paralelo se controló la pureza de las alícuotas de trabajo, mediante el plaqueo de 100 uL en agar sangre.

Los protocolos descritos para la preparación de alícuotas madre y de trabajo fueron aportados por el Dr. Moon Nahm del Laboratorio de Patógenos Respiratorios Bacterianos de la Universidad de Alabama en Birmingham, Estados Unidos (disponibles en [www.vaccine.uab.edu](http://www.vaccine.uab.edu)), que constituye uno de los dos centros mundiales de referencia de la Organización Mundial de la Salud en neumococo.

## 3.2. Ratones.

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6, hembras, de 6-8 semanas de edad provistos por el Bioterio del Instituto Pasteur de Montevideo (IPMONT), Uruguay. Los ratones *Il17a<sup>-/-</sup>*, deficientes en IL-17A, con fondo genético C57BL/6 fueron obtenidos a través de una colaboración con el Dr. Yochiro Iwakura de la Universidad de Tokyo, Japón. Estos ratones fueron generados reemplazando los exones 1 y 2 del gen *Il17a* por un gen con resistencia a neomicina (Nakae et al., 2002), los cuales también fueron criados en el bioterio del Instituto Pasteur de Montevideo (IPMONT), Uruguay. Durante la experimentación, los ratones fueron mantenidos en la Unidad de Experimentación Animal (UEA) del Departamento de Desarrollo Biotecnológico ubicada en el Instituto de Higiene, dentro de un aislador con cajas individualmente ventiladas, con filtros de aire de entrada y salida (Labsystems), y con agua y ración *ad libitum*. El cuarto cuenta con temperatura y humedad controlada y ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad.

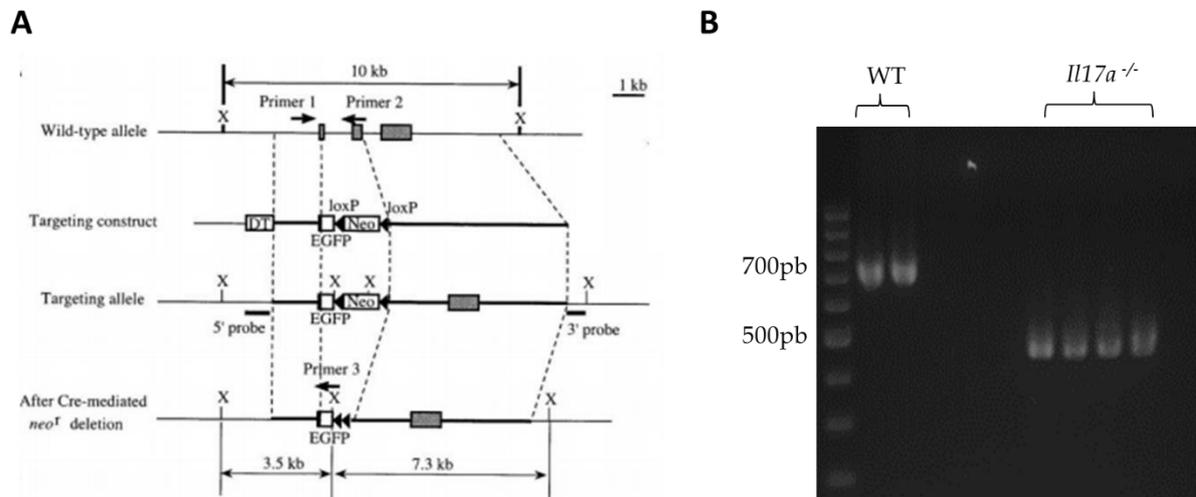
Toda manipulación de los animales infectados, tanto salvajes como deficientes, fue realizada dentro de una cámara de flujo laminar (clase II A2, ESCO, Pennsylvania-USA) ubicada dentro del laboratorio de experimentación animal del Instituto de Higiene, incluido el cambio de camas.

Los protocolos utilizados en esta tesis fueron presentados y aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República (código de aprobación: 08-05-10).

### 3.2.1. Genotipado de la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*

Para realizar el genotipado de los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* se purificó el ADN genómico utilizando el Kit DNeasy Mini Spin (QUIAGEN) siguiendo las instrucciones indicadas en la sección *Spin-Column*. Brevemente, 50 a 100  $\mu$ l de sangre periférica de los animales a estudiar fueron mezclados con 20  $\mu$ L de proteinasa K, ajustándose el volumen a 220  $\mu$ L finales con PBS 1x. Luego se siguieron los lavados con los distintos buffers del Kit hasta finalmente obtener 100  $\mu$ L conteniendo el ADN genómico (ADNg). La concentración y pureza del mismo se evaluó en el nanodrop (Nanodrop 1000 Thermo Fisher Scientific). Luego se llevaron a cabo las reacciones de PCRs con primers diseñados específicamente para amplificar ADN genómico flanqueante a la zona de inserción del gen de resistencia a la neomicina en el caso de los *Il17a<sup>-/-</sup>* y a los exones 1 y 2 en el caso de la cepa salvaje. Se utilizó un mismo primer *forward* para ambas cepas (5'-ACTCTTCATCCACCTCACACGA-3') y distintos primers *reverse* (WT: 5'-GTACACCAGCTATCCTCCAGATAG-3'; KO: 5'-TCCTTGAAGTCGATGCCCTTCA-3'). Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa de 2,5%, junto con un marcador de peso

molecular (GeneRuler de 100bp Thermo Fisher). El producto de PCR obtenido en el caso de la cepa salvaje tiene un tamaño de 700pb y el de los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* es de 500pb.



**Fig 3.1. A)** Esquema que muestra cómo fueron generados los ratones *Il17a<sup>-/-</sup>*. El ADN genómico que contiene el gen *Il-17a* se aisló de la biblioteca de fagos genómicos 129 / SVJ de ratón (Stratagene, La Jolla, CA). Se construyó un vector de direccionamiento reemplazando el fragmento genómico de 2,1 kb con el fragmento de ADN de 2,5 kb que contiene el gen EGFP y el gen de resistencia a la neomicina (*neo*) bajo el control del promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK) 1 que estaba flanqueado por secuencias P lox. El fragmento contenía el primer y segundo exón, que iban desde el codón de iniciación ATG hasta un sitio *Sna*BI entre el segundo y el tercer exón. Un gen de la toxina de la difteria A (DT) bajo el MC1se unió al extremo 5' del fragmento genómico para la selección negativa (Nakae et al., 2002) **B)** Electroforesis en gel de agarosa de 2,5% de los productos de PCR obtenidos de ambas cepas de ratones junto con un marcador de peso molecular (GeneRuler de 100bpThermo Fisher). El amplicón de la cepa salvaje tiene un tamaño de 700pb y el de los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* es de 500pb.

### 3.2.2. Complementación de animales *Il17a<sup>-/-</sup>* con rIL-17A.

El restablecimiento del fenotipo salvaje en animales *Il17a<sup>-/-</sup>*, se llevó a cabo utilizando 3 grupos de esta cepa de ratones. Se probó la combinación de 2 dosis diferentes de IL17A recombinante para cada grupo de ratones *Il17a<sup>-/-</sup>*. Para comenzar se realizó la inoculación vía i.n. con Pn1 en su dosis colonizante. Y luego, al día 21 y al día 24 post inoculación, que es cuando la cepa salvaje ya eliminó por completo la colonización por neumococo, se administraron distintas combinaciones de dos dosis de rIL-17A, también por vía intranasal. Las dosis probadas fueron las siguientes:

- 0.1µg/5µL + 1.0µg/5µL de IL-17 r
- 0.1µg/5µL + 0.1µg/5µL de IL-17 r
- 0.01µg/5µL + 0.01µg/5µL de IL-17r

Como control, se utilizaron animales *Il17a<sup>-/-</sup>* y animales salvajes, que sólo recibieron el inóculo subletal de neumococo pero no la citoquina recombinante. Finalmente, al día 27 (72hrs después de la última dosis de rIL17A), los animales fueron sacrificados y se realizaron lavados nasofaríngeos para determinar la carga bacteriana como se describió en la sección 3.5.

### 3.3. Colonización por Pn1.

#### 3.3.1. Preparación del inóculo.

Para establecer el modelo de colonización nasofaríngea, se utilizó una dosis de Pn1 de  $2,0 \times 10^4$  ufc en  $10 \mu\text{L}$ . Para la preparación del inóculo de infección, se descongeló una de las alícuotas de trabajo (3.1.1) y luego de centrifugar a  $2500g$  por 5 minutos, a temperatura ambiente (TA), se descartó el sobrenadante y las bacterias fueron lavadas con solución salina apirógena (calidad inyectable). Finalmente las bacterias fueron resuspendidas en el volumen de solución salina correspondiente para obtener la dosis requerida en  $10 \mu\text{L}$ . En todos los casos, la concentración de bacterias viables fue verificada en cada ensayo de infección, realizando diluciones seriadas y plaqueo en agar sangre.

#### 3.3.2. Infección intranasal.

Los animales fueron anestesiados con  $200 \mu\text{L}$  de una mezcla que contiene ketamina ( $11 \text{mg/mL}$ ) y xylacina ( $0.55 \text{mg/mL}$ ), administrados por vía intraperitoneal (i.p.). Se esperó 10 minutos a que los animales estuvieran totalmente sedados, para luego administrar el inóculo subletal de neumococo ( $2 \times 10^4$  ufc/ $10 \mu\text{L}$ ), por vía intranasal, con pipeta y de a gotas, en ambas narinas.

### 3.4. Necropsia y obtención de muestras.

En todos los ensayos de esta tesis los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y según cada caso, se extrajeron diferentes órganos, sangre y/o se realizaron lavados nasofaríngeos para ser utilizados en citometría de flujo, RT-qPCR o para recuento de carga bacteriana, según se indica.

#### 3.4.1. Extracción de sangre y obtención de suero.

A los distintos tiempos establecidos, se tomaron muestras de sangre de al menos 7 ratones por grupo. Las mismas fueron obtenidas por punción del seno sub-maxilar con el fin de determinar los niveles de

anticuerpos específicos en suero contra polisacárido capsular de neumococo serotipo 1 (PnPS1) o contra el polisacárido C.

### **3.4.2. Obtención de lavado nasofaríngeo (NAL).**

Para los ensayos de determinación de carga bacteriana en lavados nasofaríngeos, se utilizaron 25 ratones por cepa (WT o *Il17a<sup>-/-</sup>*), dado que por punto se sacrifican 4 ratones.

Para llevar a cabo los lavados nasofaríngeos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y luego disecados de modo de exponer la cavidad nasofaríngea. Se introdujo una pipeta Pasteur de punta fina en la cavidad nasofaríngea (Fine Tip Pastette, Alpha Laboratories Ltda., UK) conteniendo 1mL de suero fisiológico. Una vez colocada se hizo pasar el suero por toda la cavidad recogiendo las gotas que salieron por las narinas. Luego de colectado, el NAL se mantuvo en hielo hasta su procesamiento. Para la cuantificación de determinadas citoquinas como IL-4 o TNF- $\alpha$ , las muestras se guardaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

### **3.4.3. Obtención de tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT).**

En la totalidad de los experimentos se realizó primero la obtención del NAL y posteriormente se llevó a cabo la extracción del NALT. Luego de realizado el NAL, se realizan dos cortes a nivel de la mandíbula, desde la comisura de la boca hacia ambas orejas, exponiendo el paladar. Con una pinza curva de punta fina se tomó uno de los extremos y se extrajo el tejido, el cual fue guardado en 250 $\mu$ L de Trizol para realizar RT-qPCR o en FACS-EDTA (PBS-1 Mm EDTA, 1% suero fetal bovino) si iba a ser procesado para citometría de flujo.

## **3.5. Determinación de carga bacteriana en NAL.**

Para realizar el recuento bacteriano en NAL, se hicieron diluciones seriadas de los lavados originales y las mismas fueron plaqueadas por triplicado en placas de agar sangre conteniendo gentamicina, para eliminar la contaminación con otras bacterias  $\alpha$ -hemolíticas de la microbiota nasofaríngea. Las placas fueron incubadas 18h en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y finalmente se procedió al recuento para determinar la carga bacteriana presente.

## 3.6. Evaluación de la respuesta inmune

### 3.6.1. Detección de anticuerpos séricos anti polisacárido 1 y anti polisacárido C.

La respuesta de anticuerpos IgG e IgM, específicos contra el polisacárido capsular 1, se evaluó mediante una adaptación del ELISA de 3ra generación usado en humanos (Wernette et al., 2003). Se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Medium Binding, Greiner) con 100  $\mu$ L de una solución 4  $\mu$ g/mL de polisacárido capsular tipo 1 (American Type Culture Collection, ATCC) en PBS, durante 5h a 37°C, en cámara húmeda. Las muestras fueron pre-adsorbidas con 5  $\mu$ g/mL de polisacárido C (PS-C, Staten Serum Institute, Copenhagen, Denmark) y 5  $\mu$ g/mL de polisacárido capsular tipo 22F (ATCC), en PBS-0.05% Tween20 en una dilución final 1/50 e incubadas por 30 min a temperatura ambiente (TA). Luego de lavar las placas con buffer Tris salino (TBS) conteniendo 0.01% de Brij-35 (buffer de lavado), se agregaron 50  $\mu$ L de cada una de las muestras por duplicado y se incubó toda la noche a TA. Luego de lavar 5 veces con buffer de lavado se agregaron 100  $\mu$ L por pocillo de una dilución 1/1000 de anticuerpo secundario biotinilado específico contra IgG de ratón o dilución 1/500 de un anticuerpo secundario biotinilado específico contra IgM de ratón (ambos de SIGMA) y se incubó toda la noche a 4°C. Finalmente, luego de lavar, se agregaron 100  $\mu$ L/pocillo de sustrato TMB (3,3',5,5' Tetrametilbenzidina, BD) y se incubó por 15- 30 min hasta detener la reacción por agregado de 50  $\mu$ L/pocillo de 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se leyó la absorbancia a 450nm (con referencia a 630 nm) en un lector de microplacas (MRX II, Dynex Technologies). En cada placa se sembró, en paralelo, una curva estándar preparada con diluciones seriadas de un suero positivo considerado como referencia. Esta referencia fue preparada a partir de sueros de varios ratones que habían mostrado ser positivos mediante esta técnica de ELISA. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias interpoladas en dicha curva estándar.

### 3.6.2. Depleción de células CD4<sup>+</sup>.

#### Producción de Anticuerpos GK1.5 y HB152.

La depleción de células CD4<sup>+</sup> se llevó a cabo utilizando los anticuerpos monoclonales anti- CD4 producidos en sobrenadantes del hibridoma GK 1.5.

El hibridoma GK1.5 (anti-CD4) produce anticuerpos de rata de tipo IgG2b, específicos contra este antígeno de superficie presente en las células CD4<sup>+</sup> murinas. Dichas células se conservaron congeladas en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso. El medio de congelación usado contiene 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10% de DMSO y se congelaron con una densidad de 5x10<sup>6</sup> cél/mL. Para

comenzar la producción de los anticuerpos monoclonales (AcMo) fue necesario lavar las células con medio de expansión (DMEM con alto contenido en glucosa, 5% de SFB, glutamina y antibiótico–penicilina/estreptomina). Se centrifugaron a 400G por 3 minutos. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo previamente templado a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, y colocadas en botellas de cultivo T25. Una vez alcanzado un 80% de confluencia, se comienza con el proceso de expansión de las células. Para esto, se siembran 4x10<sup>5</sup> cél/mL en botellas T125, y una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células son lavadas con DMEM libre de SFB y resuspendidas en medio libre de suero fetal, denominado OptiMem (Invitrogen, USA). Luego de 4 días, se recoge el sobrenadante y se guarda a -20°C hasta su procesamiento para la purificación del anticuerpo monoclonal (AcMo), por cromatografía de afinidad (Hi Trapprotein G), utilizando el equipo AKTA Purifier (General Electric). Finalmente, el AcMo purificado se cuantifica mediante el método de Bradford para determinación de proteínas. Se almacena a -20°C hasta su uso en los ensayos animales.

Un procedimiento similar se llevó a cabo para producir y purificar el anticuerpo utilizado como control de isotipo (IgG2b), utilizando el hibridoma HB152.

### Depleción

Previamente se había puesto a punto en el laboratorio un protocolo de depleción de células CD4<sup>+</sup> en donde se determinó que una dosis de 100µg/200µL vía i.p. es suficiente para depletar dichas células tanto en sangre como en pulmón.

Para llevar a cabo el experimento se utilizaron 3 grupos, de 8 ratones cada uno, de la cepa salvaje. Uno de los grupos recibió el anticuerpo GK1.5 (anti-CD4<sup>+</sup>) otro recibió el control de isotipo (HB152), y el tercer grupo solo recibió solución salina sirviendo como segundo control. Los 3 grupos recibieron la dosis de colonización (2x10<sup>4</sup> ufc/10µL) de Pn1 al día 0. Sin embargo, tanto el grupo depletado como el de control de isotipo, recibieron 4 dosis de 100µg/200µL de anticuerpo anti-CD4o anti- IgG2b, respectivamente, vía i.p, a los días -1, 1, 4 y 7, para mantener la depleción en el tiempo. A su vez, los mismos días que los animales recibieron la dosis de anti-CD4<sup>+</sup> también se tomaron muestras de sangre para poder comparar posteriormente, los niveles de anticuerpos producidos por los 3 grupos.

### 3.6.3. Extracción de ARN, RT y qPCR.

#### Extracción de ARN.

El estudio de la expresión de los distintos mensajeros en respuesta a la colonización, en ambas cepas de ratones, se hizo por RT-qPCR. Los lavados nasofaríngeos fueron centrifugados a 4°C a 300G. El sobrenadante, se guardó en alícuotas de 100µl a -80°C, para ser luego utilizado para la cuantificación

de citoquinas por ELISA. El pellet conteniendo las células fue resuspendido en 200  $\mu\text{L}$  de trizol y guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

La extracción de ARN a partir de Trizol se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, California-USA). A modo de resumen, luego de realizar un paso de extracción con cloroformo para purificar el ARN, se realizó una precipitación con alcohol isopropílico. En esta etapa se agregaron 2,5 $\mu\text{L}$  de glicógeno, para optimizar la precipitación de ARN, ya que es una muestra con poca cantidad de células. A continuación, se hizo un último lavado con etanol 75% y se resuspendió en 20 $\mu\text{L}$  de agua ultra pura libre de RNasa y DNasa (Invitrogen). Luego de incubara  $60^{\circ}\text{C}$ , 10 minutos, se cuantificó la concentración de ARN obtenido con el equipo nanodrop (Thermo Scientific) por absorbancia a 260nm, midiendo a su vez la relación 260/280 y 260/230 para evaluar la pureza.

### Retrotranscripción.

Para llevar a cabo la retrotranscripción se partió de 1  $\mu\text{g}$  de ARN total. En primer lugar se realizó el tratamiento con DNasa I (100 U, Invitrogen). Se agregaron 0,4  $\mu\text{L}$  de la enzima en el buffer correspondiente, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, y se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de EDTA 25 mM (Invitrogen) dejándolo a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Luego se realizó la retrotranscripción usando 1  $\mu\text{L}$  de “random hexamers” (200 ng, Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (dinucleótidostrifosfatos 1 mM de cada tipo), 1  $\mu\text{L}$  de RNasa Out (40 U/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen), 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0.1M (Invitrogen) y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (200 U/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen) en buffer provisto por el fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Corbett CG1-96 con el siguiente programa: 10 min a  $25^{\circ}\text{C}$ ; 50 min a  $37^{\circ}\text{C}$ ; 15 min a  $70^{\circ}\text{C}$ . El ADN copia (cDNA) fue diluido 1:5 con  $\text{H}_2\text{O}$  ultra pura (InvitroGen) para luego realizar la reacción de PCR en tiempo real (qPCR).

### qPCR.

La reacción de qPCR se realizó usando los pares primers específicos a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  cada uno, 2  $\mu\text{L}$  de cDNA y 5  $\mu\text{L}$  de QuantiTectSybr® Green (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La qPCR se llevó a cabo en el termociclador en tiempo real 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem). El ciclado usado fue de 15 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguido de 40 ciclos de 15 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$ ; 1 minuto a  $60^{\circ}\text{C}$ , y finalmente la disociación a  $60 - 95^{\circ}\text{C}$  (aumentando  $1^{\circ}\text{C}$  cada 5 segundos). El análisis de datos se realizó en el programa provisto por el fabricante. Se utilizaron primers murinos existentes en el laboratorio y algunos pares de primers diseñados por mí (Tabla 3.1) Para el diseño se utilizó la herramienta Primer Blast del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) y se usó el programa Oligo Analyzer 3.1 de “Integrated DNA Technologies” para analizar las temperaturas de melting y evaluar la posible formación de dímeros.

**Tabla 3.1.** Secuencia de primers murinos utilizados para qPCR. \* diseñados para esta tesis.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5`-3`</b>
β-actin-F	GCTTCTTTCAGCTCCTTCGT
β-actin-R	CGTCATCCATGGCGAACTG
Cxcl1-F	CTTGGTTCAGAAAATTGTCCAAAA
Cxcl1-R	ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT
Il10-F	CATTTGAATTCCTGGGTGAGA
Il10-R	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT
Il6-F	GTTCTCTGGGAAATCGTGAAAA
Il6-R	AAGTGCATCATCGTTGTCATACA
Tnfa-F	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA
Tnfa-R	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT
Il17a-F	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC
Il17a-R	GGGTCTTCATTGCGGTGG
Ifng-F	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA
Ifng-R	CCGCTTCTGAGGCTGGAT
Tgfb-F	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT
Tgfb-R	GAGTTTGTTATCTTTGCTGTCACAAGA
Foxp3-F	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT
Foxp3-R	TTCTCACAACCAGGCCACTTG
mIL2_F	CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA
mIL2_R	CTTTCAATTCTGTGGCCTGCTTGGG
mIL-23_F	GCCCCGTATCCAGTGTGAAG
mIL-23_R	CGGATCCTTTGCAAGCAGAA
RORC F	CAATTTGGAAGTGGCTTTCC
RORC R	CTGAAGAGTTCCTTATAGAG
* mMIF-F	GCCCGCACAGTACATC
* mMIF-R	ATGTAGACCCGGTCCGGG
* mCD206 F	GGCAGGATCTTGGAACC TAGTA
* Mcd206 R	CCTTTC TTCCGACTCTT CACCC
* mINOS F	ACATCGACCCGTCCACAGTAT
* mINOS R	CAGAGGGGTAGGCTTGTCTC
* mIL22_F	TTTCTGACCAAACCTCAGCA
* mIL22_R	TCTGGATGTTCTGGTCGTCA
* mIL-17F_F	CCCATGGGATTACAACATCACTC
* mIL-17F_R	CACTGGGCTCAGCGATC
mCxcl2_F	CCCTCAACGGAAGAACCAAA
mCxcl2_R	CACATCAGGTACGATCCAGGC
mp35_Il12_F	ATCACACGGGACCAAACCA
mp35_Il12_R	CAGGCAACTCTCGTTCTTGTGTAGT
mIl1beta_F	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
mIl1beta_R	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
mIL-4_F	ACAGGAGAAGGGACGCCAT
mIL-4_R	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA
mCcl2_F	AGCTCTCTTCTCCACCAC
mCcl2_R	CGTAACTGCATCTGGCTGA

## 3.7. Citometría de flujo

### 3.7.1. Procesamiento y análisis de muestras de NAL y NALT.

El NALT se extrajo tal como se describió en la sección 3.4.3 e inmediatamente fue colocado en 500  $\mu$ L de FACS-EDTA (PBS 1x + EDTA 5mM + 1% de SFB) y mantenido en hielo hasta el momento de su procesamiento para citometría de flujo. Se realizó un pool con las muestras de NALT de los animales de cada grupo. Se realizó la disgregación del tejido por raspado utilizando un bisturí, hasta obtener una suspensión celular la cual fue filtrada utilizando un filtro de 70 $\mu$ m (BD). Se centrifugó a 300 g por 5 minutos y luego se procedió al recuento de células viables con Trypan Blue, en cámara de Neubauer. Las muestras de NAL, fueron centrifugadas a 300g por 5 minutos, conservándose el sobrenadante a -80°C para medir citoquinas. El pellet fue resuspendido en FACS-EDTA. Se hizo un pool de cada grupo de animales y se realizó el recuento celular.

A continuación las células (de NAL o NALT) fueron marcadas, como se indica a continuación, con un panel de anticuerpos monoclonales (F4/80-APC; Ly6G-PE, CD45-FITC) para diferenciar las distintas poblaciones celulares de interés, siguiendo el protocolo general de marcado.

### 3.7.2. Protocolo general de marcado de anticuerpos

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células por tubo de citometría y se bloquearon los receptores Fc mediante incubación con 1  $\mu$ L de Fc Block (BD) por 20 minutos a 4 °C. A continuación, se realizó el marcado con los anticuerpos monoclonales específicos (BD) por 30 minutos a 4°C y luego de los lavados, las células fueron fijadas con formaldehído al 4%, lavadas y conservadas en FACS EDTA a 4°C en oscuridad hasta el momento de su adquisición. Las células se adquirieron y analizaron en un citómetro FACS Canto II (BD) utilizando el programa FacsDiva (BD).

### 3.7.3. Protocolo para marcar células T reguladoras

Se utilizó el kit Mouse Foxp3 buffer set (BD) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se preparó la suspensión celular de NALT y se bloquearon los receptores Fc como se describió anteriormente. En primer lugar, se marcó con los anticuerpos monoclonales conjugados para el marcado en superficie (CD3-PerCP, CD25-APC, CD4-APC-Cy7) y luego de realizar la fijación y permeabilización, se marcó con el anticuerpo específico para FoxP3 (FoxP3-PE) o con el control de isotipo correspondiente. Dado que se realizó la marcación intranuclear que no es fijada, las células debieron ser adquiridas inmediatamente.

### 3.8. ELISA para determinación de citoquinas

La cuantificación de TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 en muestras de lavado nasofaríngeo fue realizada por ELISA utilizando un par de anticuerpos monoclonales específicos (captura y detección), y diluciones seriadas del estándar de TGF- $\beta$  o IL-4 recombinante con el que se preparó una curva de calibración, siguiendo las instrucciones del fabricante (todos los reactivos de BD Pharmingen, USA). Brevemente, placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) fueron sensibilizadas con 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpo de captura (50  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ ), toda la noche (o/n), a 4°C. Luego de lavar con PBS-0.05% Tween20 (PBS-T), las placas fueron bloqueadas con 100  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$  de PBS conteniendo 7% suero fetal bovino (SFB, Capricorn) e incubadas por 2 h a TA. Luego de lavar 3 veces con PBS-T se sembraron 50  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$  de muestra (sin diluir) o estándar. Se prepararon 9 diluciones seriadas de estándar, en PBS - 7%SFB, cubriendo un rango de 75 a 10.000  $\text{pg}/\text{mL}$ . La placa sembrada fue incubada toda la noche a 4°C y luego de los lavados correspondientes se agregó el anticuerpo de detección biotinilado (50  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS-3%BSA) y se incubó 2 h a TA. Finalmente se agregaron 50  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$  de extravidina conjugada a peroxidasa (dil: 1/2000, Sigma) y se reveló por agregado de 50  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$  de TMB (3,3',5',5'-Tetramethylbenzidine, SIGMA). Luego de 15-30 minutos se detuvo la reacción de desarrollo de color por agregado de 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y se midió absorbancia a 450nm (con referencia a 630nm) en un lector de microplacas (MRX II, Dynex Technologies). Los resultados se expresan como concentración de TNF- $\alpha$ , IL-4 o IL-10(en  $\text{pg}/\text{mL}$ ) obtenidos luego de interpolar los valores de absorbancia en la curva estándar utilizando el software Revelation v 4.02 (DynexTechnologie).

### 3.9. Evaluación de la actividad bactericida de los macrófagos.

#### 3.9.1. Cultivo de células L929.

Para llevar a cabo la diferenciación de progenitores de médula ósea (BMDC) a macrófagos se utilizó el sobrenadante de las células L929 ya que estos fibroblastos producen entre otras citoquinas, M-CSF, que es el factor de crecimiento estimulante de colonias de macrófagos (Rios, Touyz, & Montezano, 2017). Para esto, se descongeló una alícuota de la línea celular L929 y se pasó rápidamente a un medio RPMI-1640 con 10% de SFB. Las células se centrifugaron a 300G por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Luego de realizar el recuento en cámara de Neubauer, las células fueron resuspendidas en RPMI con 15%de SFB, a una densidad de  $1 \times 10^6$  células por mL, sembrándose 15 mL en una botella T75. Las células se mantuvieron en estufa a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . La confluencia de las botellas se observó diariamente hasta alcanzar el 80%, y a partir de ese momento se procedió a la expansión hasta

tener 5 botellas T125 con un 80% de confluencia. A partir de este momento, cada 4 días se colectó el sobrenadante de cada una de las botellas, los cuales fueron pooleados, filtrados, y congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se realizaron 3 etapas de recolección de sobrenadante por cada T125, durante 12 días.

### 3.9.2. Extracción de células de médula ósea.

Se realizó la extracción de células de la médula ósea para su posterior diferenciación a macrófagos. Para esto se sacrificaron, por dislocación cervical, 2 ratones de la cepa salvaje y dos de la cepa  $Il17a^{-/-}$  con no más de diez semanas de edad. La disección y extracción del fémur y tibia se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Se extrajeron los huesos, se eliminaron los restos de tejido muscular con bisturí, se limpiaron con alcohol 70 % y se colocaron en una placa de Petri con DMEM. Los huesos fueron cortados en ambos extremos dejando expuesta la médula ósea. Luego, con una aguja de 23-25G, se inyectaron 5mL de DMEM recogiendo las células en un tubo, las que fueron centrifugadas a 300 G por 5 min a  $20^{\circ}\text{C}$ , descartándose el sobrenadante. Luego de lisar los glóbulos rojos, las células fueron lavadas y finalmente resuspendidas en 5 mL de DMEM.

### 3.9.3. Diferenciación de BMDM a macrófagos.

Las células de médula ósea obtenidas en la sección anterior se contaron en cámara de Neubauer con Trypan Blue y fueron resuspendidas a  $5 \times 10^5$  células/mL en DMEM con 10% SFB y 20% sobrenadante L929 y se sembraron 15 mL por cada placa de Petri. Se realizó un recambio de medio a los 4 y 7 días de cultivo, y luego se despegaron los macrófagos con PBS frío y en hielo. Se extrajeron aproximadamente un millón de células diferenciadas, y se confirmó por citometría de flujo, mediante el marcado con F4/80, que presentaban el fenotipo de macrófago.

### 3.9.4. Obtención de macrófagos peritoneales

Tres ratones de la cepa salvaje y otros 3 de la cepa  $Il17a^{-/-}$ , fueron inoculados por vía i.p. con 1 mL de caldo tioglicolato, tal como ya ha sido descrito en múltiples trabajos previos. Tres días después, los animales fueron sacrificados y se realizaron tres lavados de la cavidad peritoneal con 5 mL de PBS. Las células se centrifugaron a 400g durante 10 min y se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo para luego ser sembradas en placas de cultivo. Al cabo de 4 horas, se realizaron lavados con PBS para

retirar las células no adheridas. Las células adherentes son mayoritariamente macrófagos, tal como ya ha sido mostrado por otros autores (Layoun, Samba, & Santos, 2015).

### 3.9.5. Evaluación de la actividad microbicida de macrófagos.

Los macrófagos derivados de médula ósea o los extraídos de la cavidad peritoneal, tanto de animales WT como *I17a<sup>-/-</sup>*, fueron plaqueados a una concentración de  $5 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 24 pocillos (Greiner), incubando 2h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adhesión de las células. Finalmente, se agregó neumococo, a una multiplicidad de infección (MOI) de 100, dejando como control al menos 3 pocillos conteniendo solo las bacterias (sin células). A las 4h se tomaron 100 µL de sobrenadante de una fila (3 pocillos) y se realizaron 3 diluciones seriadas al décimo con solución salina estéril. Tanto el sobrenadante original como las diluciones se plaquearon en placas de agar sangre para realizar el recuento de bacterias.

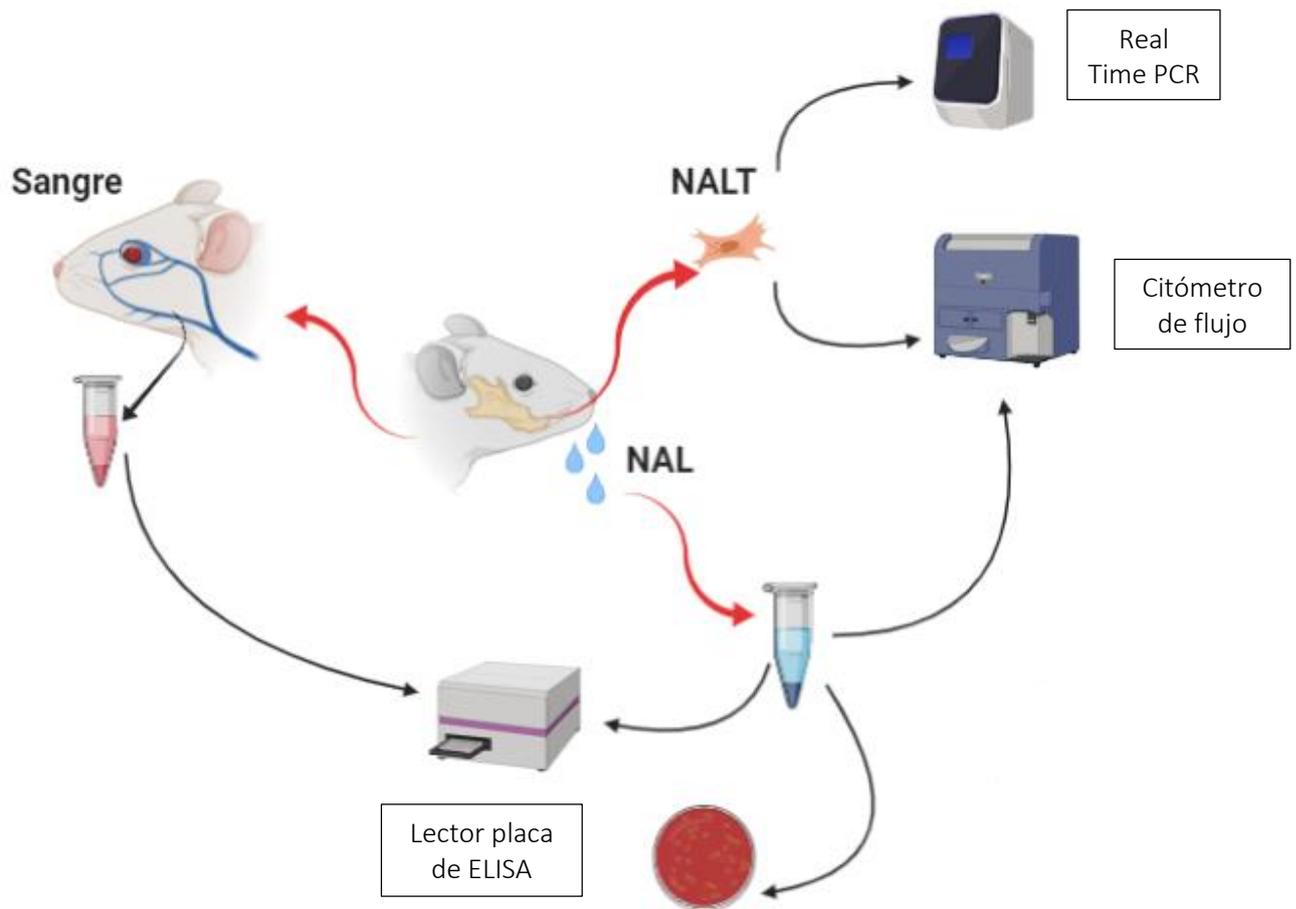
## 3.10. Depleción de microbiota.

Como primer aproximación para evaluar el rol de la microbiota durante la colonización por neumococo se realizó un tratamiento con una mezcla de antibióticos por vía oral y luego se realizó un desafío de colonización. El ensayo consistió en 4 grupos de animales, dos de la cepa salvaje y dos de la cepa *I17a<sup>-/-</sup>*. Tanto la viruta como el agua utilizada para los bebederos, durante todo el experimento estuvieron autoclavadas. A uno de los grupos de la cepa salvaje y uno de los grupos de la cepa *I17a<sup>-/-</sup>* se les administró agua estéril conteniendo un cócktail de antibióticos (400µg/mL de kanamicina; 35 µg/mL de colistina; 35 µg/mL de gentamicina; 45 µg/mL de vancomicina; 215 µg/mL de metronidazol), de manera análoga a trabajos publicados por otros autores (Siegel, Tamashiro, & Weiser, 2015b). Luego de 5 días de tratamiento con antibióticos, todos los animales, tanto los del grupo control como los tratados con antibióticos recibieron la dosis de colonización de Pn1 ( $2 \times 10^4$  ufc/10uL). Se sacrificaron cuatro animales por grupo a los días 5, 15 y 30 post colonización y se realizó el recuento bacteriano en lavados nasales.

## 3.11. Análisis Estadístico.

Para el análisis de la diferencia de medias entre dos grupos se utilizó el test Mann-Whitney, salvo cuando se analizó la estadística entre más de dos grupos que se utilizó el test One-way ANOVA y post test de comparación múltiple de Dunnett con respecto al grupo control (día cero de la cepa salvaje). Se

consideraron significativos los valores de  $p < 0.05$  y altamente significativos los valores de  $p < 0.01$ . En todos los casos, el análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego California USA).



**Esquema 2.** Se muestra de manera esquemática con qué técnica vamos a analizar las muestras que se extraen del ratón.

## Capítulo 4. Resultados

### 4.1. Modelo de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* serotipo 1

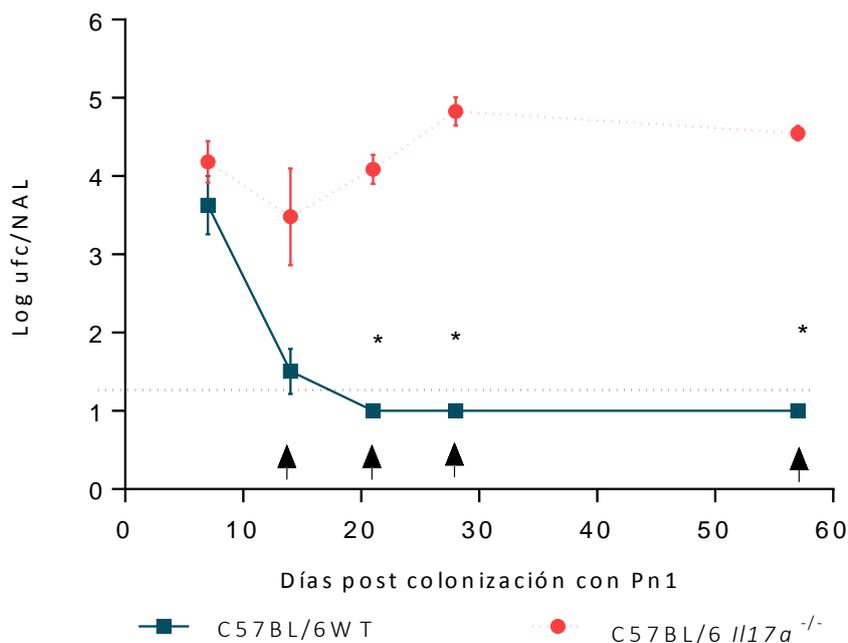
Como ya fue mencionado, la colonización nasofaríngea por neumococo es un pre requisito para el eventual desarrollo de alguna de las enfermedades que causa este patógeno (otitis media, neumonía, entre otras). Es por esto, que nuestro grupo de investigación ha estado trabajando en el desarrollo de modelos murinos de colonización nasofaríngea por cepas de *S. pneumoniae*. Para esto, fue necesario establecer la dosis exacta de anestesia a utilizar. Se ha reportado que el tipo de anestésico influye tanto en la patogénesis de la neumonía neumocócica como en la respuesta inmune frente a la infección en ratones, así como también que la profundidad de la sedación es clave para la entrega de una dosis precisa de bacterias en las vías respiratorias (Rubins & Charboneau, 2000). Se utilizó la ruta intranasal (i.n.) como vía natural de infección, habiendo determinado la dosis y el volumen de inóculo bacteriano adecuados para inducir la colonización nasofaríngea asintomática por neumococo. A modo de resumen, se estableció que la administración de 200 $\mu$ L de una mezcla de ketamina (11mg/mL) y xilacina (0.55 mg/mL), por vía intraperitoneal, era el procedimiento óptimo para lograr una completa sedación de los animales. También, se demostró que resultaba clave la espera de 10 minutos antes de la administración de la dosis intranasal de neumococo (2x10<sup>4</sup> ufc/10 $\mu$ L), para evitar la eventual muerte de los animales. En la puesta a punto del modelo, se comprobó que la instilación de 10  $\mu$ L de inóculo permite que la carga bacteriana permanezca a nivel de nasofaringe siendo mínima la carga que llega a pulmón, de donde es rápidamente eliminada (en las primeras 18h).

La cepa de serotipo 1 utilizada en este trabajo corresponde a un aislamiento clínico obtenido de sangre de un paciente con diagnóstico de neumonía (Pn1). El serotipo 1 es uno de los serotipos más prevalentes en nuestra región. A su vez, es la misma cepa con la que nuestro grupo ha estado trabajando en los modelos de neumonía aguda, habiendo mostrado que una dosis de 2x10<sup>7</sup> ufc, administrada por vía i.n., tanto en un volumen de 10 $\mu$ L como de 50  $\mu$ L, resulta 100% letal (Marqués et al., 2012b; Muñoz et al., 2010; A. Rial et al., 2016; M. A. Rial, n.d.)

Se comparó la cinética de colonización nasofaríngea inducida por Pn1 en animales salvajes (WT) e IL-17A deficientes, para lo cual se cuantificó la carga bacteriana en lavados nasofaríngeos obtenidos a distintos tiempos luego de suministrada la dosis colonizante.



**Esquema 1.** Esquema que representa la metodología para llevar a cabo la cinética de carga bacteriana en lavados nasofaríngeos (NAL) realizados 7, 14, 21, 28 y 57 días después de la administración de una dosis subletal ( $2 \times 10^4$  ufc/10  $\mu$ L) de *S. pneumoniae* serotipo 1.



**Figura 4.1.** Cinética de carga bacteriana en lavados nasofaríngeos (NAL) realizados 7, 14, 21, 28 y 57 días después de la administración de una dosis subletal ( $2 \times 10^4$  ufc/10  $\mu$ L) de *S. pneumoniae* serotipo 1. La línea punteada en negro corresponde al límite de detección de la metodología utilizada. Los asteriscos denotan una diferencia estadísticamente significativa de esa cepa entre ese punto y su día cero. Las flechas indican que existen diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto (Test de Man Whitney). Media  $\pm$  SEM de 6 animales por grupo y por punto.

En primer lugar, se observó que al día 7 ambas cepas de ratones tenían una carga bacteriana similar entre sí, y del mismo orden que el inóculo administrado inicialmente (Figura 4-1). Los animales salvajes mostraron una mayor dispersión dentro del grupo, que estaría asociada a que algunos de estos

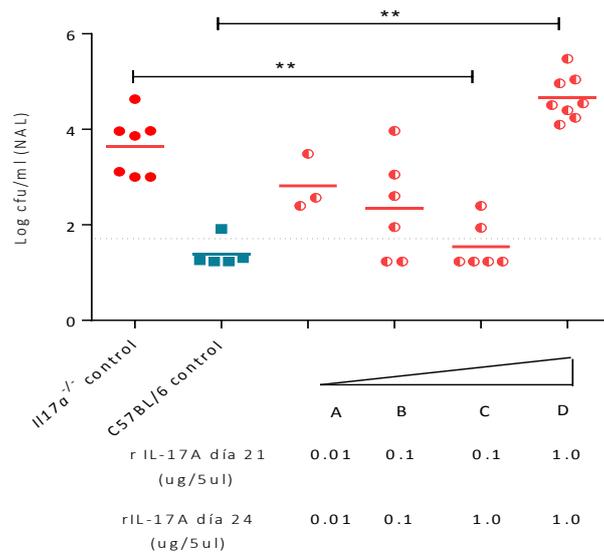
animales comenzaban a eliminar la colonización. En este sentido, al día 14, se observó que los animales salvajes presentaron recuentos cercanos al límite de detección de la técnica, manteniéndose en esos niveles hasta el final del ensayo. Por el contrario, los animales deficientes en IL-17A (*Il17a<sup>-/-</sup>*), si bien al día 14 mostraron una tendencia hacia una disminución en la carga bacteriana, posteriormente mostraron un incremento, superando incluso la dosis inicial, y manteniéndose así por hasta 8 semanas (57 días) que es el último día registrado en este ensayo. Estos resultados mostraron que la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* permanecía colonizada de manera persistente durante todo el ensayo, mientras que la cepa salvaje eliminó la colonización de manera eficiente entre el día 7 y 14.

Estos resultados muestran inequívocamente que IL-17A desempeña un papel central en la eliminación de la colonización nasofaríngea por Pn1 y es en base a este resultado que decidimos ahondar en los mecanismos efectores de IL-17A como citoquina clave para el control de la colonización por esta cepa de neumococo.

## 4.2. Restablecimiento del fenotipo salvaje.

En base al resultado mostrado anteriormente, nos interesó demostrar si era posible complementar a los animales *Il17a<sup>-/-</sup>*, mediante la administración exógena de IL-17A recombinante, de modo que estos pudieran controlar la colonización. Se trata de un ensayo que presenta una enormidad de variables, y que no era posible abordarlas todas. Por un lado, estaba la determinación de las dosis y vías de administración de la citoquina recombinante, así como los tiempos óptimos para administrarlas y el tiempo en el cual evaluar la carga bacteriana en nasofaringe. La citoquina recombinante a utilizar en estos ensayos debe ser de calidad apropiada, libre de contaminantes como azida de sodio, y en general se dan dosis relativamente altas. Decidimos, realizar ensayos en animales *Il17a<sup>-/-</sup>*, que hubieran recibido el desafío de colonización 21 días antes, ya que a este tiempo la cepa salvaje eliminó por completo la colonización por Pn1 mientras que la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* permanece colonizada.

Dado que no hay suficiente información en bibliografía sobre ensayos de restablecimiento de fenotipo salvaje en animales *Il17a<sup>-/-</sup>*, decidimos probar con distintas dosis de IL-17A recombinante (detalladas en la Figura 4-2), administradas a los días 21 y 24. La carga en lavados nasales fue evaluada al día siguiente de la segunda dosis (día 25 post colonización)



**Figura 4.2.** Restablecimiento del fenotipo salvaje en animales deficientes para Il17a (●). Se muestra el log en base 10 de la carga bacteriana en lavados nasales (NAL) realizados 25 días luego de la colonización por *S. pneumoniae* serotipo 1 (Pn1), para cada grupo de animales. Los grupos A, B, C y D recibieron dos dosis i.n. de IL-17A recombinante (rIL-17A) a los días 21 y 24 post colonización (dosis detalladas en la figura). Se incluyeron como control grupos de animales salvajes (WT, ■) e Il17a<sup>-/-</sup> (●) que sólo recibieron la dosis colonizante de Pn1. Los asteriscos denotan una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. La línea horizontal representa la Media del grupo. n= 4 a 7 animales/grupo. Test de Man Whitney, \* p<0.05.

El grupo que recibió las dosis más bajas de rIL-17A, presentó igual carga bacteriana que el grupo control Il17a<sup>-/-</sup> (Figura 4.2-A), mientras que los que recibieron ambas dosis de 0.1 ug mostraron una tendencia hacia el restablecimiento del fenotipo salvaje, ya que dos de los animales de este grupo eliminaron la carga bacteriana (Figura 4.2-B). El grupo de animales que recibió 0.1 µg y 1.0 µg de rIL-17A se asemejó al comportamiento que tiene la cepa salvaje. Dentro de ese grupo, cuatro ratones eliminaron completamente la carga bacteriana mientras que dos permanecían colonizados, pero manteniéndose uno o dos órdenes por debajo del nivel de carga del grupo Il17a<sup>-/-</sup> control (grupo C, figura 4.2). Sin embargo el grupo que recibió la carga más alta de rIL17A (Fig 4.2-D) mostró un comportamiento opuesto, en donde se puede observar que la carga bacteriana superó en un orden a la presentada por el grupo control. Esto concuerda con resultados publicados por otros autores que muestran que el aumento de la dosis de rIL-17A en animales WT inhibe su propia producción por parte de las células CD4 y células Tγδ, además de inhibir la producción de otras citoquinas proinflamatorias (Kinyanjui, Shan, Nakada, Qureshi, & Fixman, 2013). En este caso en particular que estamos trabajando con animales deficientes para esa interleuquina, y tomando lo planteado por esos autores, se podría pensar que el aumento en el agregado de la rIL17A podría determinar una menor proporción de citoquinas pro-inflamatorias en el sitio de infección, favoreciendo así que neumococo pueda replicarse. Pero estas no son más que suposiciones dado que no hay publicados trabajos como para poder contrastar

resultados, ni hemos ahondado en analizar la expresión de otros mediadores inflamatorios en esos animales tratados con las dosis mayores de IL17A.

En suma, estos ensayos mostraron que la administración exógena de la citoquina IL17A recombinante a animales *Il17a*<sup>-/-</sup> previamente colonizados, permitió restablecer casi al 100 % el fenotipo mostrado por la cepa salvaje, reforzando la importancia de esta citoquina en la eliminación de la colonización nasofaríngea.

### 4.3 Respuesta humoral frente a la colonización por Pn1.

Varios grupos de investigación ya han postulado que los anticuerpos específicos contra antígenos de neumococo serían necesarios para el control de la colonización y que esa respuesta confiere protección frente a una segunda exposición a la bacteria (Cohen et al., 2011<sup>a</sup>; Jambo, Sepako, Heyderman, & Gordon, 2010). A su vez, se ha descrito que IL-17A, y en particular las células Th17, podrían actuar como células T colaboradoras (Mitsdoerffer et al, 2010). Tanto el polisacárido capsular de tipo 1 (PnPS1) como el polisacárido C (PS-C), que es común a todos los serotipos, tienen la particularidad de ser zwitteriónicos, por lo que pueden ser cargados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC II) y de esta forma pueden activar células T CD4<sup>+</sup> (Groneck et al, 2009). Dentro del total de polisacáridos capsulares de neumococo, el serotipo 1 es el único con esta característica descrito hasta el momento.

Es por esto que resultó interesante estudiar, por un lado, cómo es la respuesta humoral de ambas cepas frente a la colonización por Pn1 y, por otra parte, ver si la ausencia de IL17A interfiere en la respuesta de anticuerpos frente a estos dos antígenos. Es así que durante los 21 días post colonización con Pn1, a la vez que se tomaron muestras para evaluar la carga bacteriana en nasofaringe, también se tomaron muestras de suero y de lavados nasofaríngeos para evaluar por ELISA los niveles de distintas inmunoglobulinas producidas en respuesta a la colonización.

#### 4.3.1. Evaluación de la producción de anticuerpos específicos contra polisacárido capsular1 (PnPs1) y polisacárido C (Ps-C)

##### 4.3.1.1. Anticuerpos IgM, IgG e IgA anti PnPs1 séricos inducidos durante la colonización por Pn1.

Tanto los animales salvajes como los *Il17a*<sup>-/-</sup> presentaron un aumento significativo en los niveles de IgM con respecto a su día cero a los distintos tiempos de la cinética de colonización, mostrando un máximo al día 7 (Figura 4.3-A). En lo que respecta a IgG, los animales salvajes mostraron un aumento significativo

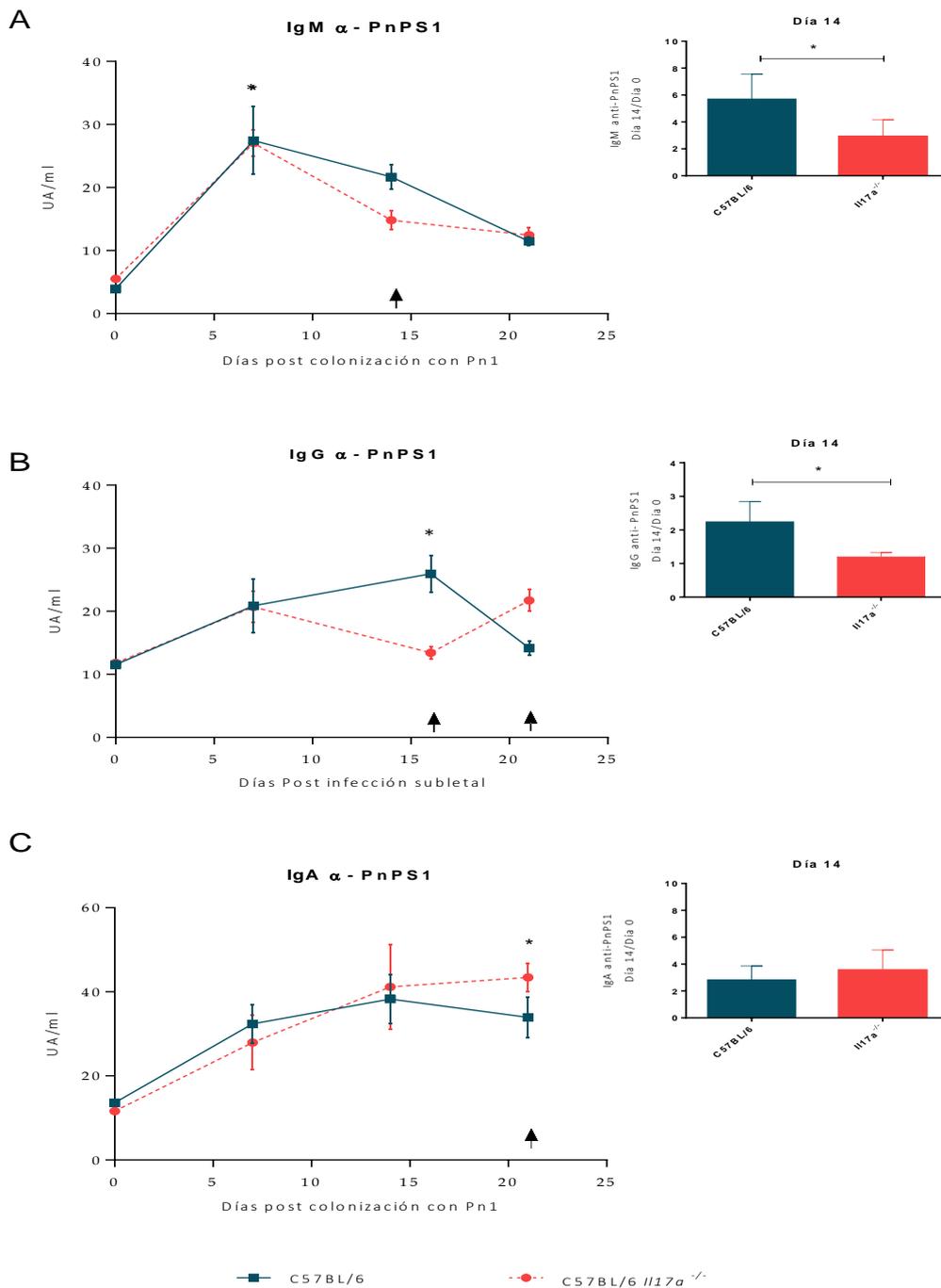


Figura 4.3. Detección de anticuerpos IgM (A) IgG (B) e IgA (C) específicos contra el polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 1 (PnPS1) en suero de animales salvajes (WT: línea llena azul) e Il17a<sup>-/-</sup> (línea punteada roja) obtenidos 7, 14 y 21 días luego de la colonización por Pn1 (2.0x10<sup>4</sup>ufc/10uL). Los asteriscos denotan una diferencia estadísticamente significativa de esa cepa entre ese punto y su día cero. Las flechas indican que existen diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto. El grafico de barras muestra la Media  $\pm$  SEM del cociente entre el día 14 con respecto al día 0, para cada cepa, para IgM (arriba), IgG (centro) e IgA (abajo). \*, p<0.05, Test de Man Whitney. Media  $\pm$  SEM de 6 animales por punto.

al día 14, mientras que los animales *Il17a*<sup>-/-</sup> mostraron incrementos significativos a los días 7 y 21 (Figura 4.3-B). En el caso de IgA, ambas cepas mostraron una cinética similar con un máximo al día 14 que se mantiene hasta el día 21 (Figura 4.3-C). Interesantemente, cuando se compararon los cocientes entre los niveles de anticuerpos (IgM e IgG) entre el día 14 y el día 0, para cada cepa, los animales salvajes mostraron un mayor incremento que los *Il17a*<sup>-/-</sup>. En el caso de IgA ambas cepas mostraron un incremento similar, sin diferencias significativas (Figura 4.3, gráficos de barras).

#### 4.3.1.2. Subclases de IgG anti PnPs1 inducidas en suero durante la colonización por Pn1.

Ha sido previamente reportado que las cepas de ratones consanguíneos con el alelo *Igh1-b*, como es el caso de los ratones C57BL/6, no tienen el gen para IgG2a y en su lugar expresan el isotipo IgG2c (Martin, Brady, & Lew, 1998; Petrushina et al., 2003). Es por esto, que se analizó la subclase IgG2c en lugar de IgG2a.

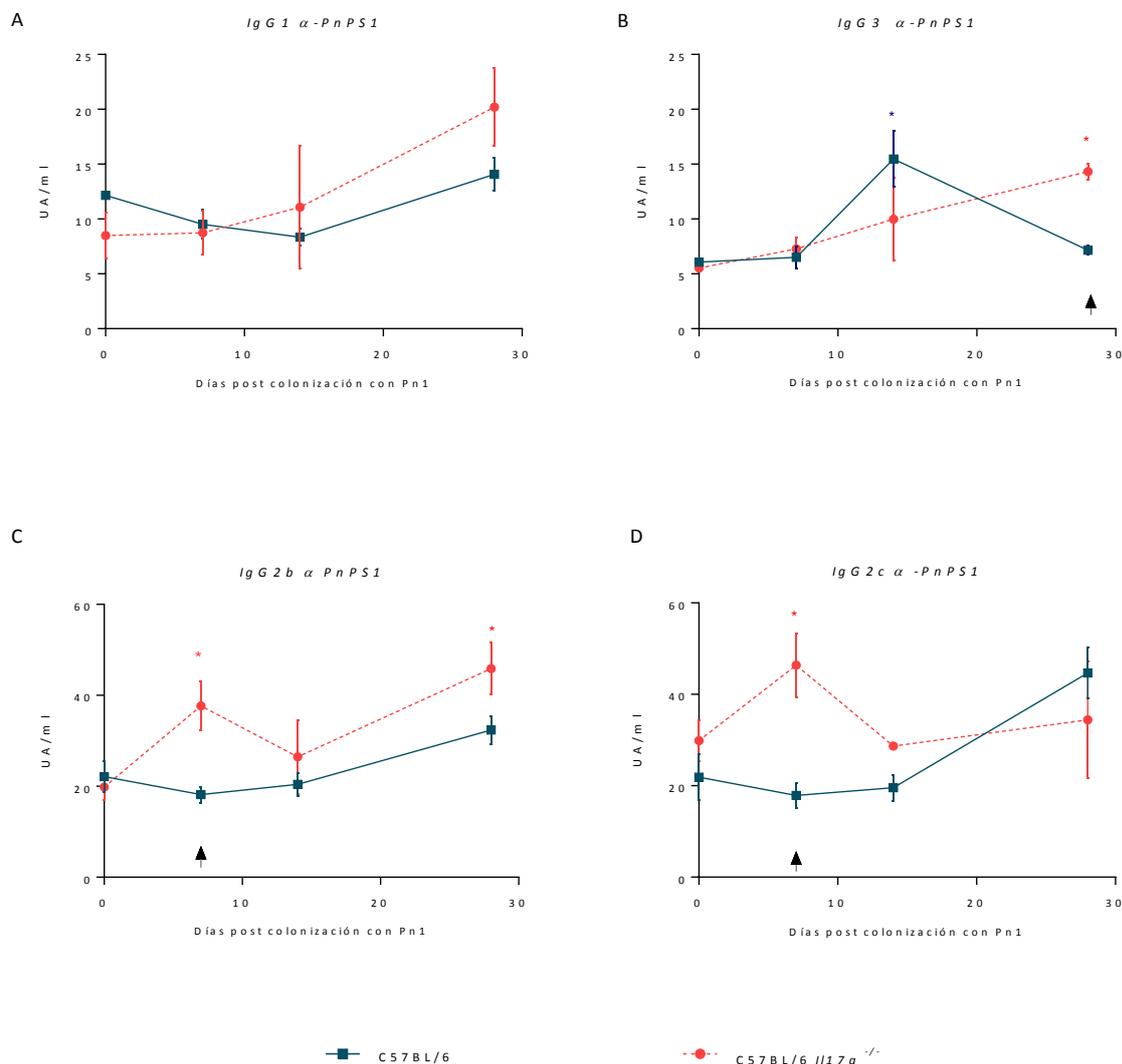
La cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> presentó un aumento significativo en los niveles de IgG1 e IgG3 al día 28 en comparación con el día 0, así como un aumento en IgG2b e IgG2c al día 7 (Figura 4.4). Puntualmente, la cepa salvaje sólo presentó un aumento en los niveles de IgG3 al día 14, que luego disminuyeron hacia el final de la cinética, pero no para el resto de las subclases.

#### 4.3.1.3. IgM, IgA, IgG y subclases de IgG anti PnPs1 analizados en NAL.

Por otra parte se puso a punto el ELISA para la detección de IgA, IgM, IgG y subclases de IgG anti PnPs1 en muestras de lavados nasofaríngeos (NAL). En primer lugar, importa señalar que los niveles de anticuerpos detectados en las muestras de NAL fueron bajos, lo cual podría deberse a que el lavado se realiza en 1 mL de PBS, y podrían entonces quedar muy diluidos. Se realizaron varios intentos para disminuir este volumen, pero no fue posible dado que las pérdidas de volumen durante el procedimiento hacían que aumentara mucho la variabilidad entre las muestras obtenidas entre los distintos animales.

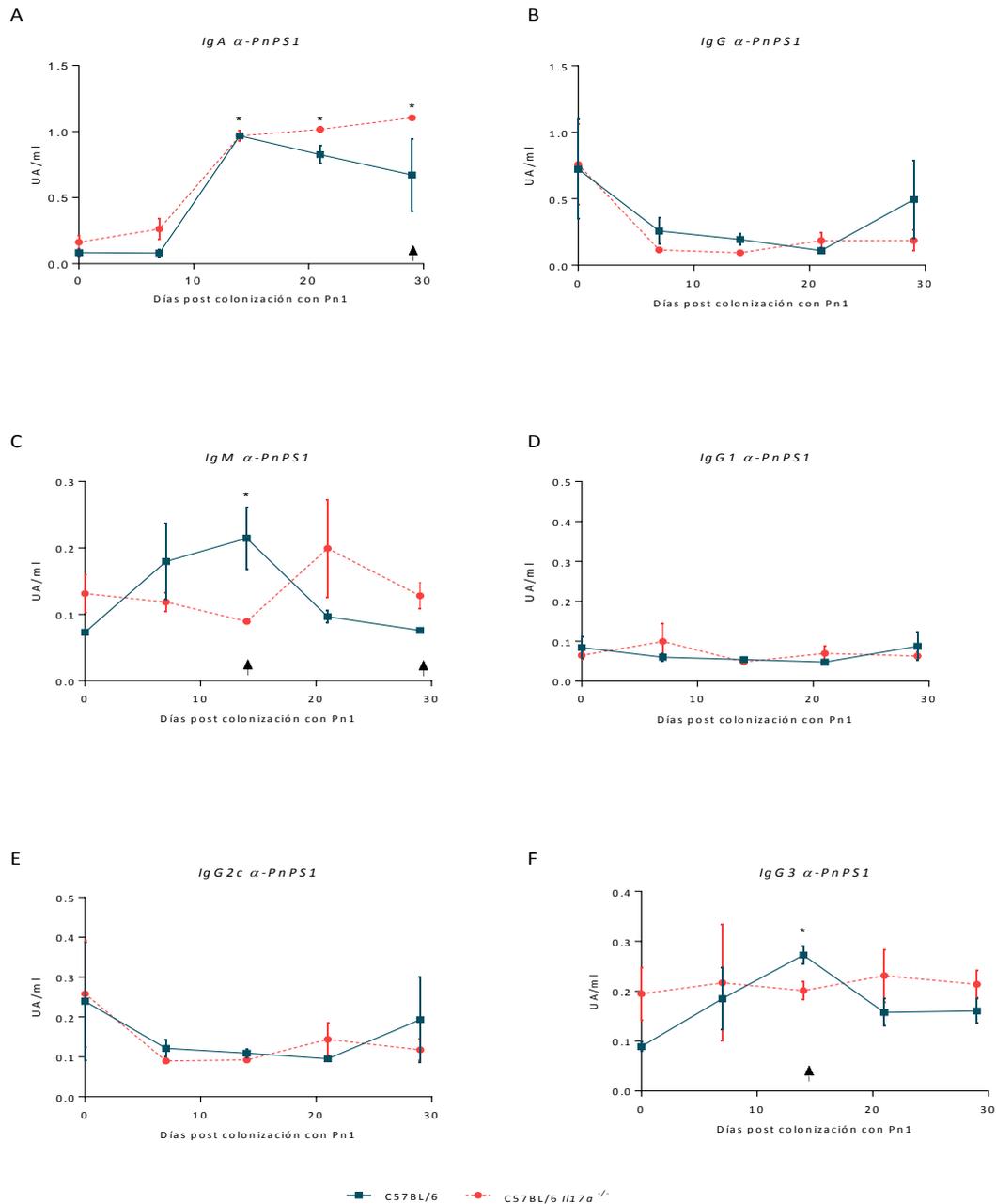
En lo que respecta a los niveles de IgA, ambas cepas mostraron una cinética similar hasta el día 14 en donde la cepa salvaje encuentra su máximo con respecto a su día cero. Por el contrario, en la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> esos niveles se mantuvieron significativamente aumentados hasta el último día analizado (día 28), con respecto a su día 0 y también con respecto al grupo WT (Figura 4.5-A). No se observaron aumentos significativos en los niveles de IgG (4.5-B), IgG1 (4.5-D) e IgG2c (4.5-E), a ninguno de los tiempos analizados, para ninguna de las dos cepas de ratones. Para el caso de IgM (Figura 4.5-C) en los animales salvajes se observó un aumento sostenido hasta el día 14, que luego descendió hacia niveles

basales (días 21 y 28). En los animales *Il17a<sup>-/-</sup>*, se observó una tendencia hacia un incremento al día 21 que luego descendió hacia el día 28. Al día 14, se observaron diferencias significativas entre ambas cepas, mostrando una mayor respuesta en el caso de los WT. Finalmente, en el caso de IgG3, la cinética mostrada por la cepa salvaje fue similar a la obtenida para IgM, con un máximo al día 14 que luego disminuyó a los valores iniciales, mientras que la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*, no mostró ningún aumento a lo largo de los días. No se detectaron niveles de IgG2c en ninguna de las muestras analizadas.



**Figura 4.4.** Detección de anticuerpos IgG1 (A), IgG3 (B), IgG2b (C) e IgG2c (D) específicos contra el polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 1 (PnPs1) en suero de animales salvajes (WT: línea llena) e *Il17a<sup>-/-</sup>* (línea punteada) obtenidos 7, 14 y 28 días luego de la colonización por Pn1 ( $2.0 \times 10^4$  ufc/10uL). Los asteriscos denotan una diferencia estadísticamente significativa dentro de cada cepa, con respecto a su día cero. Las flechas indican que existen diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto (Test de Man Whitney). Media  $\pm$  SEM de 6 animales por punto

## Ac. $\alpha$ -PnPS1 en NAL de animales colonizados



**Figura 4.5.** Detección de anticuerpos IgA (A), IgG (B), IgM (C), IgG1 (D), IgG2c (E) e IgG3 (F) específicos contra el polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 1 (PnPs1) en lavados nasofaríngeos de animales salvajes (WT: línea llena) e *Il17a*<sup>-/-</sup> (línea punteada) realizados a los días 7, 14, 21 y 28 luego de la colonización por Pn1 ( $2.0 \times 10^4$  ufc/10uL). Los asteriscos denotan una diferencia estadísticamente significativa de esa cepa entre ese punto y su día cero. Las flechas indican que existen diferencias significativas entre ambas cepas en ese (Test de Man Whitney). Media  $\pm$  SEM de 6 animales por punto.

#### 4.3.1.4. IgM, IgG y Subclases de IgG anti Ps-C inducidas en suero durante la colonización por Pn1.

En la cepa salvaje, la producción de IgM aumentó gradualmente hasta el día 14, manteniéndose en niveles similares hasta el día 28. En el caso de la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* también se observó un aumento gradual llegando a su máximo nivel de IgM al día 21, mostrando una diferencia estadísticamente significativa no solo con su día cero sino también con la cepa salvaje. En el caso de IgG, la cepa salvaje mostró una curva similar a la obtenida para IgM mientras que la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* no mostró diferencias a lo largo de toda la cinética, manteniendo los niveles mostrados al día cero. Cabe resaltar que tanto para IgM como para IgG, los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* parten de valores basales más altos que los salvajes.

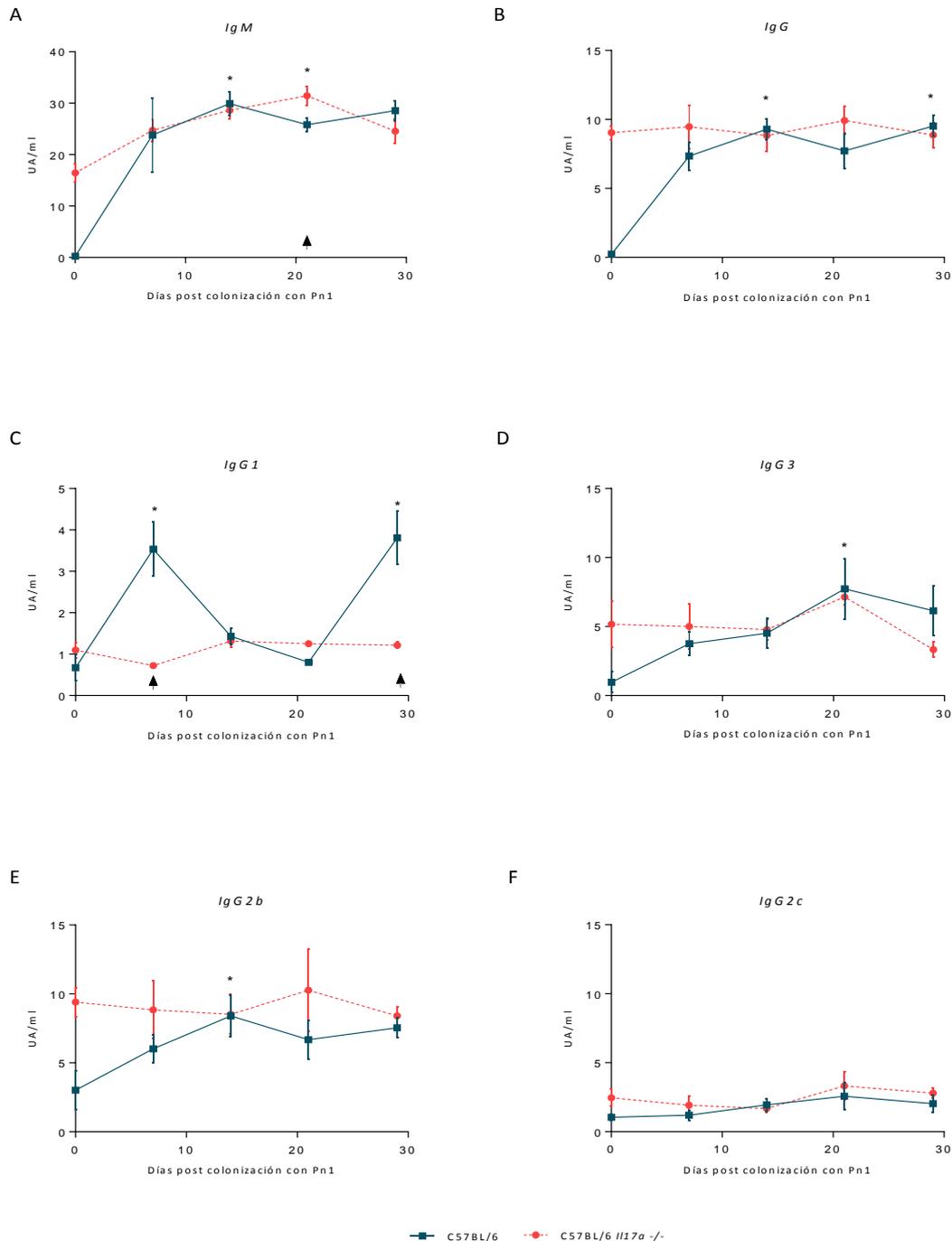
En el caso de los animales *Il17a<sup>-/-</sup>*, tampoco se observó ningún incremento en los niveles de ninguna de las subclases de IgG analizadas (IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3) a lo largo del tiempo. Es decir que en los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* no se indujo ninguna respuesta de anticuerpos IgG frente a este polisacárido de neumococo. Por el contrario los animales salvajes, mostraron una respuesta, con algunas diferencias de acuerdo a la subclase en consideración. Para IgG1, se observó un aumento significativo al día 7 que luego decayó al día 14 y 21, aumentando nuevamente hacia el día 28. IgG2b e IgG3, mostraron una tendencia hacia un aumento entre el día 14 y 21, respectivamente, mientras que para IgG2c no se observaron modificaciones en los niveles de anticuerpos a lo largo de la cinética.

En conjunto estos resultados nos sugieren que IL-17A no sería esencial para la producción de anticuerpos anti- PnPs1, ya que en ambas cepas se detectó la inducción de anticuerpos IgM e IgG específicos y también de subclases de IgG, en ambos tipos de muestras analizadas.

Por otra parte, al día 14 la cepa salvaje mostró niveles de IgM e IgG, superiores en comparación con la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* y con su propio día cero. Este punto de la cinética coincide con el momento en que la cepa salvaje elimina por completo al neumococo de nasofaringe, lo que sugiere que los anticuerpos colaborarían en la eliminación del neumococo de nasofaringe. Sin embargo, por sí solos no serían suficientes ya que la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* obtuvo niveles similares de IgM e IgG a la semana de inoculados con Pn1 y aun así permaneció colonizada en el tiempo. La respuesta de IgA contra PnPS1, tanto en suero como en lavados nasales, fue similar en ambas cepas de ratones, lo que sugiere que si bien este isotipo podría ser importante en la respuesta frente a la colonización, no sería clave, ya que los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* permanecen colonizados. Para el caso de los niveles de anticuerpos anti-Ps-C producidos por ambas cepas de animales vemos que en el caso de la cepa salvaje hay un aumento tanto para IgM como para IgG y las subclases de IgG. Con respecto a la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* se ve un aumento gradual para IgM obteniendo

su máximo al día 21. Sin embargo no hay una respuesta de IgG y por ende tampoco de sus subclases, por lo que aquí la ausencia de IL17A podría estar jugando un rol en la producción de estos anticuerpos.

## Ac. $\alpha$ -P<sub>s</sub>C en suero de animales colonizados con Pn1



**Figura 4.6.** Detección de anticuerpos IgM (A), IgG (B), IgG1 (C), IgG3 (D), IgG2b (E) e IgG2c (F) específicos contra el polisacárido C de *S. pneumoniae* en muestras de suero de animales salvajes (WT: línea llena) e *Il17a*<sup>-/-</sup> (línea punteada) obtenidas 7, 14, 21 y 28 días luego de la colonización por Pn1 ( $2.0 \times 10^4$  ufc/10uL). Los asteriscos denotan una diferencia estadísticamente significativa de esa cepa entre ese punto y su día cero. Las flechas indican que existen diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto (Test de Man Whitney) Media  $\pm$  SEM de 6 animales por punto

### 4.3.2. Respuesta de anticuerpos específicos contra PnPs1 en animales depletados de células TCD4<sup>+</sup>.

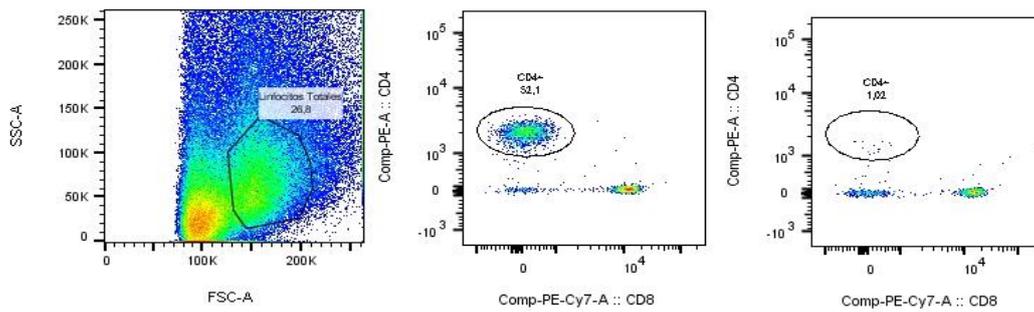
En los últimos años ha surgido evidencia considerable sobre el rol esencial que juega la respuesta celular en la colonización por neumococo, llegando a mostrarse que una respuesta protectora frente a la colonización es dependiente de células T CD4<sup>+</sup> e independiente de anticuerpos (Malley et al., 2005). En particular, en modelos en los que se tratan los animales con una vacuna inactivada de *S. pneumoniae*, se ha mostrado que son las células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-17A (Th17) el subtipo responsable de la protección frente a un posterior desafío de colonización por neumococo (Malley et al., 2005; Roche et al., 2007). Es por este motivo que nos interesó estudiar el rol de las células CD4 en la eliminación de la colonización, teniendo en cuenta que nuestro modelo de trabajo no implica ningún tratamiento o vacunación previo a la colonización. En este sentido, se realizaron ensayos de depleción sostenida de células CD4<sup>+</sup> en animales WT a los cuales se les administró la dosis colonizante de Pn1 con el objetivo de evaluar cómo era la cinética de colonización en animales salvajes, depletados en células CD4.

Cuando se analizó la carga bacteriana en nasofaringe, al día 21 post colonización, los animales que estaban recibiendo el anticuerpo anti-CD4, presentaron mayores recuentos bacterianos que los del grupo sin tratar o del grupo control, que recibió un anticuerpo isotipo control (Figura 4.7-A). Este es el último día analizado, por lo que solo podemos confirmar que al menos hay un retraso en la eliminación de la colonización, en el caso de los animales depletados, reafirmando el rol de la respuesta celular en la eliminación de la colonización. Serían necesarios nuevos ensayos, analizando a tiempos posteriores para confirmar la duración de la colonización en estos animales. El desafío aquí, es la cantidad de anticuerpo a administrar, ya que se deben dar dosis de manera sostenida desde el día previo al desafío de colonización, repitiendo cada 3 días. Este anticuerpo se obtiene por purificación a partir del sobrenadante de cultivo de un hibridoma (GK 1.5) con un bajo rendimiento si tenemos en cuenta la cantidad de anticuerpo purificado necesario para estos ensayos (100µg por punto por animal). Debido a complicaciones que surgieron en las instalaciones del bioterio los dos ensayos posteriores, a los 3 ya realizados, hubo que descartarlos.

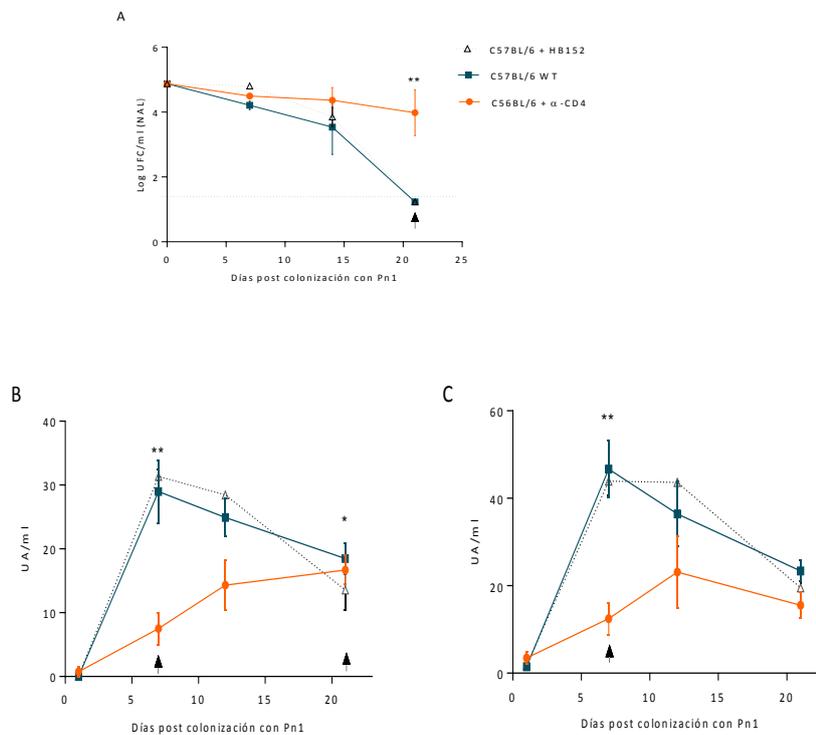
Por otra parte, se analizó la respuesta de anticuerpos IgM e IgG anti-PnPs1 en el suero de estos animales. El grupo control y el grupo salvaje (sin depletar) mostraron una cinética de IgM e IgG similar a la descrita previamente (Figura 4.6 A y B), tal como era de esperar. Sin embargo, el grupo de animales salvajes depletados, presentaron aumentos significativos en IgG e IgM, observándose un máximo al día 14, pero con niveles significativamente menores a los mostrados por los animales sin depletar, en todos los puntos analizados. Considerando que este polisacárido puede ser presentado en el contexto de MHC de clase II, se necesitaría la colaboración de las células T para inducir la maduración de afinidad,

el cambio de clase y la memoria de células B. Se podría plantear, que la ausencia de células CD4 podría estar impidiendo la respuesta humoral frente a este patógeno, y de esta forma retrasar la eliminación de la colonización.

En suma, los resultados obtenidos en esta sección muestran que los animales depletados en CD4<sup>+</sup>, no eliminaron la colonización tan eficientemente como la cepa salvaje, así como tampoco produjeron los mismos niveles de IgM e IgG, siendo su producción en comparación con los otros dos grupos, inferior en todos los tiempos estudiados. Esto sugiere, por un lado, que las células CD4 estarían participando en la respuesta de anticuerpos específica contra el polisacárido capsular, recordando que en este caso se trata de un polisacárido zwitterónico. Además, estos resultados concuerdan con trabajos similares en donde se ha visto que al colonizar con una cepa de neumococo 23F, la depleción de células CD4 conllevó a un retraso en la eliminación de la carga en los animales depletados (Z. Zhang, Clarke, & Weiser, 2009). Previamente, trabajando con este mismo serotipo van Rossum et al, 2005 también habían mostrado un retraso en la eliminación de la colonización en ratones *MHCII*<sup>-/-</sup>, habiendo sugerido en su momento que se debería a la ausencia de células Th1 que serían las responsables de la respuesta efectiva contra la colonización. Por otra parte, también hay resultados publicados que muestran que las células CD4<sup>+</sup> son importantes en la protección contra la colonización por neumococo serotipos 6B, 7F y 14 (Malley et al., 2005)(Trzcina, Thompson, Malley, & Lipsitch, 2005). En suma, nuestros resultados confirman que la respuesta de células CD4 es importante en el control de la colonización y que a su vez interfiere en la respuesta humoral temprana.



**Figura 4.7.** Confirmación por citometría de flujo de la depleción de células CD4<sup>+</sup>. Hembras C57BL/6 (n= 8) recibieron vía i.p. 100µg/200 µL de anti-CD4 al día previo a la dosis colonizante de neumococo y a los días 1, 4 y 7 post colonización. **A)** Se muestra la población de linfocitos de sangre periférica de ratón en un gráfico de dot plot FSC vs SSC. **B)** Dot plot correspondiente a sangre periférica de ratones naive. Se marcó la población CD4<sup>+</sup> con PE y la población CD8<sup>+</sup> con PE-Cy7. **C)** Dot Plot correspondiente al día 4 luego de que los ratones ya recibieran dos dosis de anti-CD4. Las muestras se analizaron en un citómetro FACS Canto II (BD) utilizando el programa FacsDiva (BD).



**Figura 4. 8.** Cinética de eliminación de carga bacteriana y evaluación de la respuesta humoral en animales WT depletados de células CD4<sup>+</sup>. (A) Carga bacteriana en lavados nasofaríngeos de animales WT (cuadrado), animales depletados de células CD4<sup>+</sup> (círculo) o animales que recibieron un anticuerpo control (triángulo). Todos recibieron vía intranasal  $2 \times 10^4$  ufc/10µL de Pn1 al día 0 y el anticuerpo correspondiente (anti CD4 o control isotipo) a los días -1, 1, 4 y 7. La línea punteada en negro corresponde al límite de detección de la metodología utilizada. Detección de anticuerpos IgM (B) e IgG (C) anti- PnPS1 producidos en respuesta a la colonización por Pn1. Los asteriscos denotan una diferencia estadísticamente significativa de esa cepa entre ese punto y su día cero. Las flechas indican que existen diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto (Test One-way ANOVA y post test de comparación múltiple de Dunnet con respecto al día cero de la cepa salvaje). Media  $\pm$  SEM de 4 animales por punto.

## 4.4. Perfil transcripcional asociado a la colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*.

Se realizó el análisis del perfil transcripcional, por RT-qPCR, en muestras de tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) de ambas cepas de ratones tomadas a distintos tiempos luego del suministro de la dosis colonizante de *S. Pneumoniae* serotipo 1.

### 4.4.1. Evaluación de la expresión del ARNm de péptidos antimicrobianos durante la colonización por Pn1

Como se mencionó anteriormente los péptidos antimicrobianos (AMP, del inglés: *antimicrobial peptides*) interaccionan con las membranas bacterianas aumentando su permeabilidad y funcionando como quimiotácticos para monocitos, neutrófilos y células T. Asimismo, esta atracción de células efectoras es regulada por los AMP de forma indirecta mediante la regulación de la liberación de quimioquinas como Cxcl1 o Ccl2, entre otras, que hacen más efectiva la respuesta inmune del hospedero en procesos inflamatorios.

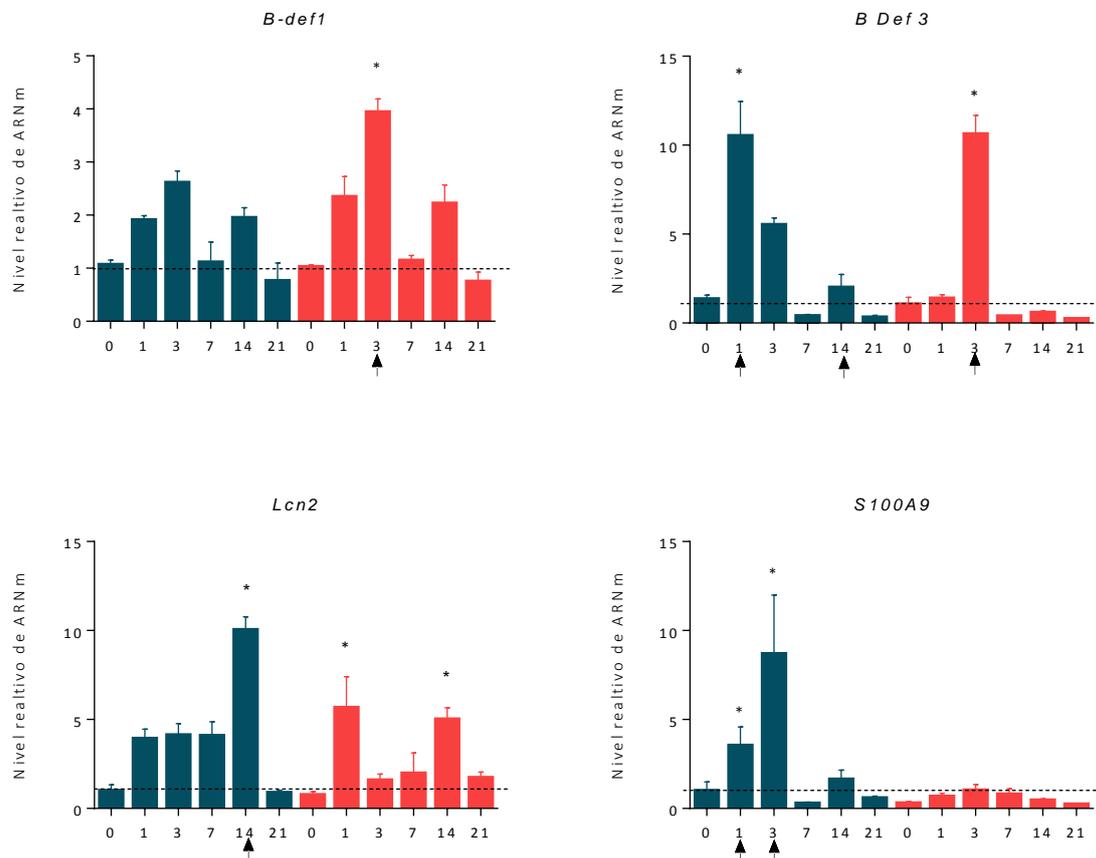
Al momento, no hay trabajos en la bibliografía que estudien la respuesta de AMP frente a la colonización por neumococo por lo que la selección de los péptidos antimicrobianos a estudiar se hizo en base a lo publicado en trabajos realizados en modelos murinos de neumonía neumocócica. En esos trabajos se ha descrito la relevancia de *lipocalina 2 (Lcn2)*, *S100a9*, *camp*,  *$\beta$ -defensina 1 y 3*, en la protección frente a la infección por neumococo (Scharf et al, 2012) (De Filippo et al, 2014).

Como se observa en la figura 4.9 vemos a modo general que ambas cepas expresan los genes estudiados en respuesta a la colonización por neumococo.

Las beta-defensinas ( *$\beta$ -Def*) 1 y 3, son ampliamente producidas en las superficies mucosas frente a señales de peligro. En el caso de  *$\beta$ def1*, ambas cepas mostraron una cinética similar, con un pico al día 3, siendo significativamente superiores los incrementos en la cepa salvaje. En el caso de  *$\beta$ def3*, también se observó una cinética similar pero los valores de expresión obtenidos son superiores a los de  *$\beta$ def1* presentando picos de expresión al día 1 para la cepa salvaje y al día 3 para la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*, manteniéndose luego con valores similares.

En el caso de *Lcn2* (C) la cepa salvaje mostró un aumento en su expresión desde el primer día de la cinética hasta el día 14 donde alcanzó su máximo. Para el caso de la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*, se observó un aumento al día 1, que luego disminuyó, manteniéndose siempre por debajo de la cepa salvaje. Con respecto a *S100a9*, los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* no mostraron ninguna modificación en sus niveles relativos a ninguno de los tiempos estudiados, mientras que los WT mostraron un incremento desde el día 1, con un máximo

día 3. Esta reportado que Il22 actúa en combinación con Il17A o Il17F, combinándose de manera sinérgica para potenciar la producción de S100a9, entre otros péptidos antimicrobianos (Liang et al., 2006). Esto estaría apoyando los resultados obtenidos en el caso de los animales *Il17a*<sup>-/-</sup>.



**Figura 4. 9.** Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de ARNm de los péptidos antimicrobianos *β-Def1*(A), *β-Def3*(B), *Lcn2* (C) y *S100a9* (D) en NALT obtenidos 0, 1, 3, 7, 14, y 21 después la colonización con  $2 \times 10^4$  ufc/10 $\mu$ l de *S. pneumoniae* serotipo 1. La cepa salvaje está representada en azul mientras que la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> se observa en rojo. Los niveles relativos de ARNm de cada gen fueron normalizados contra  $\beta$ -actina y relativizados con respecto al grupo control (día 0 de la cepa salvaje). Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al día 0, dentro de una misma cepa. Las flechas indican diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto (Test de Man Whitney). Media  $\pm$  SEM de 6 animales por punto.

Salvo para el gen *βdef1*, la cepa salvaje mostró niveles relativos de ARNm de los antimicrobianos estudiados mayores o iguales a los de la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> (Figura 4.9). Esto sugiere una mayor respuesta temprana de la cepa salvaje frente a la colonización, que podría estar asociada con la eliminación de neumococo mostrada por estos. En contrapartida, los animales *Il17a*<sup>-/-</sup>, presentaron una menor respuesta de los antimicrobianos analizados, lo que podría explicar en parte una deficiencia en el control de la colonización.

## 4.4.2. Identificación del perfil de respuesta a nivel transcripcional luego de la colonización con Pn1.

### 4.4.2.1. Análisis de los factores de transcripción y citoquinas producidas por los distintos perfiles celulares.

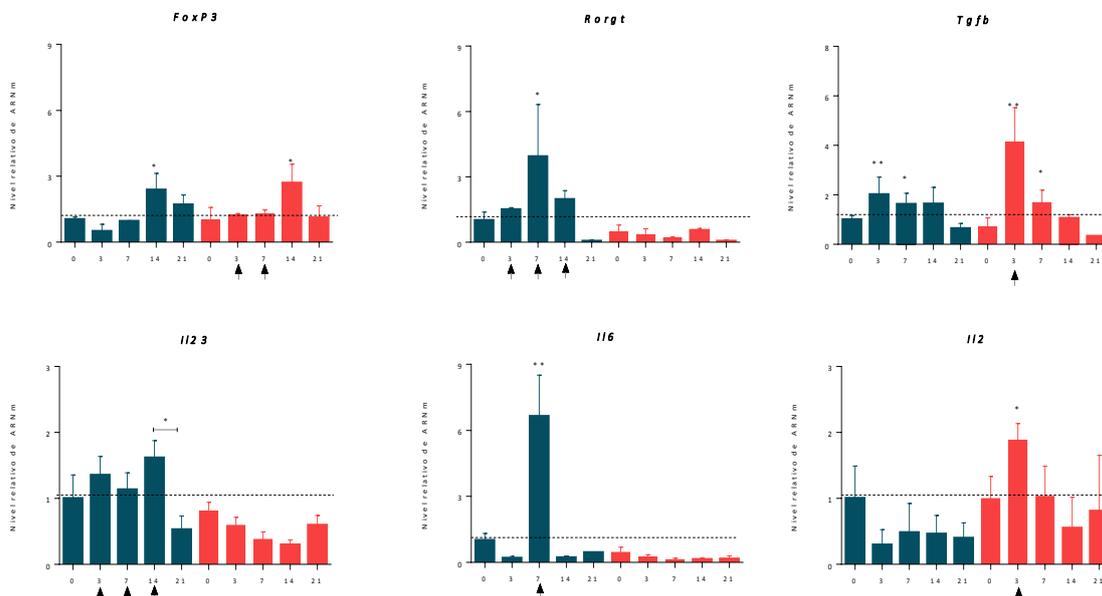
Ya hemos mencionado que la respuesta de células CD4 es relevante en el control de la colonización. Algunos autores sugerían que las respuestas Th1 serían relevantes en esta respuesta (Van Rossum et al, 2005). Más recientemente se ha reportado que la respuesta frente a la colonización por neumococo serotipo 23F se caracteriza por ser del tipo Th17 (Zhang, Clarke, & Weiser, 2009) así como también que frente a sucesivas infecciones con esta bacteria se observa que las células TH17 confieren protección frente a la colonización, haciendo más eficiente la eliminación de la carga bacteriana de nasofaringe (Lu et al., 2008). Cabe destacar que en los modelos murinos utilizados en estos trabajos, utilizan animales *Tlr2<sup>-/-</sup>*, *RAG<sup>-/-</sup>*, *Il4<sup>-/-</sup>*, *infy<sup>-/-</sup>* o *Il17<sup>-/-</sup>* (deficientes en el Receptor de IL-17A), y se evalúa la protección frente a la colonización, inducida ya sea por el uso de una vacuna basada en neumococos inactivados o bien frente a bacterias vivas. Es así, que aún está pendiente la confirmación del rol de la inmunidad mediada por células Th17 en la colonización natural por neumococo (Weiser et al, 2018). Además, en esos trabajos tampoco se ha utilizado la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* de ratones ni el serotipo 1 de neumococo, empleados en esta tesis.

La citoquina clave que producen las células TH17 es IL-17A, entre otras, y nuestros resultados muestran que su ausencia determina que los animales permanezcan colonizados de manera persistente. A su vez hay autores que describen que las células T reguladoras (Treg) también juegan un papel muy importante durante la colonización por neumococo al limitar las respuestas pro inflamatorias y permitir la persistencia de este patógeno en nasofaringe (D. R. Neill et al., 2012, 2014a). De hecho algunos autores han planteado que un baja relación Th17/Tregs se correlaciona con la colonización en niños y que esta relación aumenta con la edad a la vez que la frecuencia de colonización disminuye (Weiser et al, 2018; Mubarak et al, 2016)

En primera instancia se analizaron los niveles relativos de mRNA de *Foxp3*, *Roryt*, *Tgfβ*, *Il23-p19*, *Il6* e *Il2* a distintos tiempos (3, 7, 14 y 21 días) post colonización con Pn1. El mensajero *Il23-p19* codifica para la subunidad p19 que en conjunto con la subunidad p40, conforman el heterodímero conocido como IL23 (Vignali & Kuchroo, 2012). Por un lado, *Foxp3* y *Roryt*, son los factores de transcripción de las células T reguladoras y Th17, respectivamente. Por otra parte, *Tgfβ* junto con *Il23-p19* e *Il6* polarizan la diferenciación hacia las células Th17 mientras que *Tgfβ* e *Il2* están implicadas en la diferenciación de las células Treg. Elegimos analizar primeramente estos genes para evidenciar si en nuestro modelo de

trabajo se observaba lo publicado y referenciado anteriormente, sobre un perfil TH17 para la cepa salvaje y un perfil regulador en el caso de la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup>.

Como se observa en la figura 4.10, la expresión relativa de los mensajeros de *Tgfb*, *Il6* y *roryt* por parte de la cepa salvaje al día 7 se vio aumentada en todos los casos con respecto a su día cero. En el caso de *Foxp3* esta diferencia se observa al día 14, lo cual podría estar asociado al hecho de que en ese momento la cepa salvaje ya eliminó la carga bacteriana y sería de esperar que el perfil vire hacia uno más regulador. *Il23* por otra parte, mostró una tendencia a aumentar hacia el día 14, disminuyendo significativamente al día 21, mientras que no se observaron diferencias en los niveles relativos de *Il2* a lo largo del tiempo.



**Figura 4. 10.** Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de ARNm de *Foxp3*, *Rort*, *Tgfb*, *Il23*, *Il6* e *Il2* en muestras de NALT de animales WT (azul) o *Il17a*<sup>-/-</sup> (rojo), obtenidas 0, 3, 7, 14, y 21 después la colonización con  $2 \times 10^4$  ufc/10 $\mu$ L de *S. pneumoniae* serotipo 1 (Pn1). Los niveles relativos de ARNm de cada gen fueron normalizados contra  $\beta$ -actina y relativizados con respecto al grupo de animales control (día 0 de la cepa salvaje). Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al día 0, dentro de una misma cepa. Las flechas indican diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto (Test de Man Whitney). Media  $\pm$  SEM de 6 animales por punto.

Por otro lado, no se observaron variaciones en los niveles relativos de ARNm de *Il23*, *Il6* y *roryt*, a lo largo del tiempo, en el caso de los animales *Il17a*<sup>-/-</sup>, pero sí un incremento al día 3 en *Tgfb* e *Il2* y de *Foxp3* al día 14.

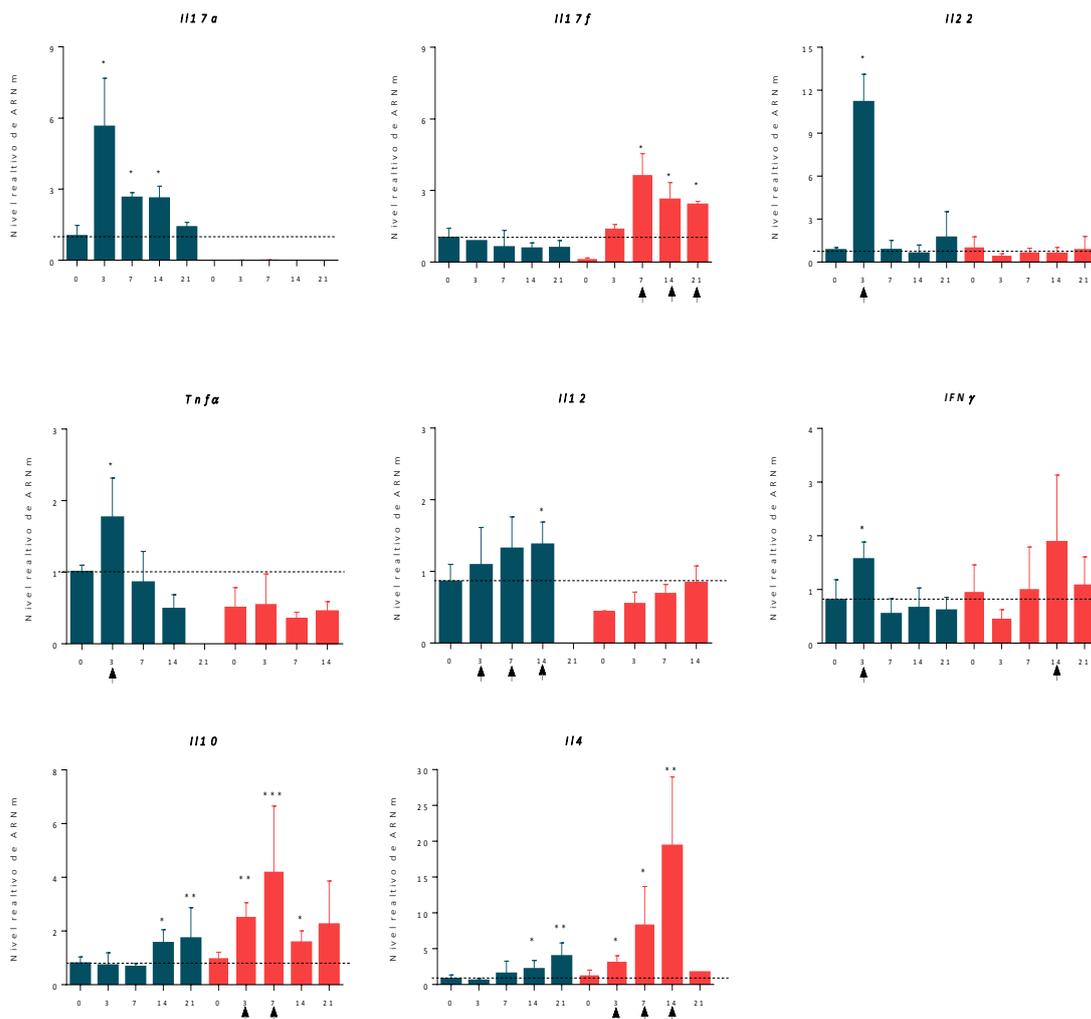
Al comparar ambas cepas entre sí, vimos que la cepa salvaje mostró niveles relativos de ARNm del factor de transcripción de las TH17, *Rort*, y de las interleuquinas involucradas en su diferenciación, *Il6* e *Il23*, significativamente superiores (a los días 3, 7 y 14) que los mostrados por la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup>. En

cambio, para aquellos mensajeros involucrados en una respuesta de tipo reguladora, como serían *Tgfb* e *Il2* es la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup>, la que mostró un incremento significativo y más temprano en comparación con la cepa salvaje al día 3. Luego de este punto los niveles relativos disminuyeron gradualmente. En el caso de *Foxp3*, y al igual que lo mostrado por la cepa salvaje, se observó un aumento significativo al día 14, y entre las cepas hay una diferencia significativa al día 3 y al día 7 siendo superior para la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup>. Es decir que los niveles relativos de los mensajeros asociados a células Tregs están aumentados en la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup>, con respecto a la cepa salvaje, desde el primer tiempo analizado.

Seguidamente lo que se hizo fue ampliar el panel a genes implicados en otras respuestas como por ejemplo las de tipo TH1, en donde evaluamos *Tnfa*, *Il12* e *Infy*, o de tipo TH2, para la cual fuimos a ver el mensajero del gen que codifica para *Il4*. Nos interesó a su vez ver qué sucedía con la expresión del mensajero de *Il10*, la cual es una interleuquina antiinflamatoria. Ahondamos en la caracterización de la respuesta de tipo TH17, analizando otros genes como *Il17a*, *Il17f* e *Il22* (Fig 4.11).

Con respecto al mensajero de *Il17a* se vio un marcado aumento post colonización en todos los puntos analizados y a su vez se confirmó la ausencia de ARNm de *Il17a* en los animales deficientes a lo largo de toda la cinética. Sin embargo, estos últimos mostraron niveles significativamente mayores de *Il17f* en el primer punto evaluado luego de la colonización, observándose un máximo al día 7, mientras que la cepa salvaje se mantuvo en sus niveles basales durante toda la cinética estudiada. Considerando que estas dos citoquinas presentan alta homología, tanto a nivel de secuencia como en cuanto sus funciones, estos resultados sugieren que los animales *Il17a*<sup>-/-</sup> estarían compensando la ausencia de *Il17a*, aumentando la expresión de *Il17f*. Con respecto al mensajero de *Il22*, se ha descrito un rol dual de esta interleuquina frente a infecciones, en particular en el caso de bacterias. Es una citoquina proinflamatoria y su actividad se ve potenciada cuando se libera en conjunto con otras citoquinas proinflamatorias, especialmente IL17A, pudiendo ser esta potenciación no siempre benéfica para el hospedero. Pero a su vez, participa en la reparación del tejido luego de una respuesta inflamatoria exacerbada (Rutz, Eidenschenk, & Ouyang, 2013).

Es así que nos resulto interesante ver qué sucedía con la expresión de este gen en ambas cepas. Por un lado, la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> no mostró modificaciones en sus niveles relativos de *Il22* durante toda la cinética. Por el contrario la cepa salvaje mostró un incremento al día 3 y luego descendió a sus niveles basales. Este incremento al día 3 coincide con el observado al día 3 para la *Il17a*, lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente.



**Figura 4.11.** Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de ARNm de *Il17a*, *Il17f*, *Il22*, *Tnfa*, *Il12*, *Ifnγ*, *Il10* e *Il4* en muestras de NALT de animales WT (azul) o *Il17a*<sup>-/-</sup> (rojo), obtenidas 0, 3, 7, 14, o 21 días después la colonización con  $2 \times 10^4$  ufc/10 $\mu$ L de *S. pneumoniae* serotipo 1 (Pn1). Los niveles relativos de ARNm de cada gen fueron normalizados contra  $\beta$ -actina y relativizados con respecto al grupo de animales control (día cero de la cepa salvaje). Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al día, dentro de una misma cepa. Las flechas indican diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto (Test de Man Whitney). Media  $\pm$  SEM de 6 animales por punto.

En lo que respecta a los genes relacionados con una respuesta de tipo TH1, fuimos a mirar puntualmente *Tnfa*, *Infjg* e *Il12*. *Tnfa* e *Ifng* mostraron una cinética similar, con un máximo al día 3, siendo mayores los niveles relativos en la cepa salvaje en comparación con los animales *Il17a*<sup>-/-</sup>. En el caso de *Il12* la cepa salvaje presentó un aumento significativo al día 14 con respecto a su día cero. Los animales *Il17a*<sup>-/-</sup> no presentan ningún incremento en los niveles relativos de ARNm para ninguno de estos 3 genes analizados a lo largo de toda la cinética (Figura 4-11).

Por otra parte, se analizaron los mensajeros que codifican para las citoquinas IL-10 e IL-4. Por un lado, trabajos publicados en donde han estudiado si la presencia de IL-10 es perjudicial o favorable durante la neumonía neumocócica, han mostrado que la ausencia de IL-10 es benéfica a la hora de eliminar el

neumococo de nasofaringe ya que modula la producción de citoquinas pro-inflamatorias y el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. Pero se vio a su vez más mortalidad en los ratones *Il10<sup>-/-</sup>* debido a la respuesta exacerbada del sistema inmune (Peñaloza et al., 2015). A su vez, estudios hechos en modelos de colonización nasofaríngea por neumococo demostraron que, al igual que en los humanos, los ratones neonatos y de temprana edad, mostraban una colonización más persistente y los autores lo asociaron a que en esos ratones estaba aumentada la expresión de IL-10, la cual está implicada en la inhibición de la función de los macrófagos y la expresión de MHC de clase II (Debby Bogaert et al., 2009). Por su parte, IL-4 es conocida, entre otras funciones, por inhibir la proliferación de las células TH1 y favorecer la proliferación de las células TH2 (Lazarski, Ford, Katzman, Rosenberg, & Fowell, 2013). Trabajos publicados han demostrado que la eliminación de la colonización nasofaríngea por neumococo es debido a las células TH17, evaluando la relevancia de la IL-4, que es la interleuquina mayoritariamente producida por las células TH2 (Lu et al., 2008). En este trabajo los ratones *Il4<sup>-/-</sup>* eliminan la colonización mientras que los animales deficientes para el receptor de IL17A, permanecen colonizados. Algo similar sucede en nuestro modelo ya que IL-4 se ve más expresada en los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* y estos permanecen colonizados en el tiempo.

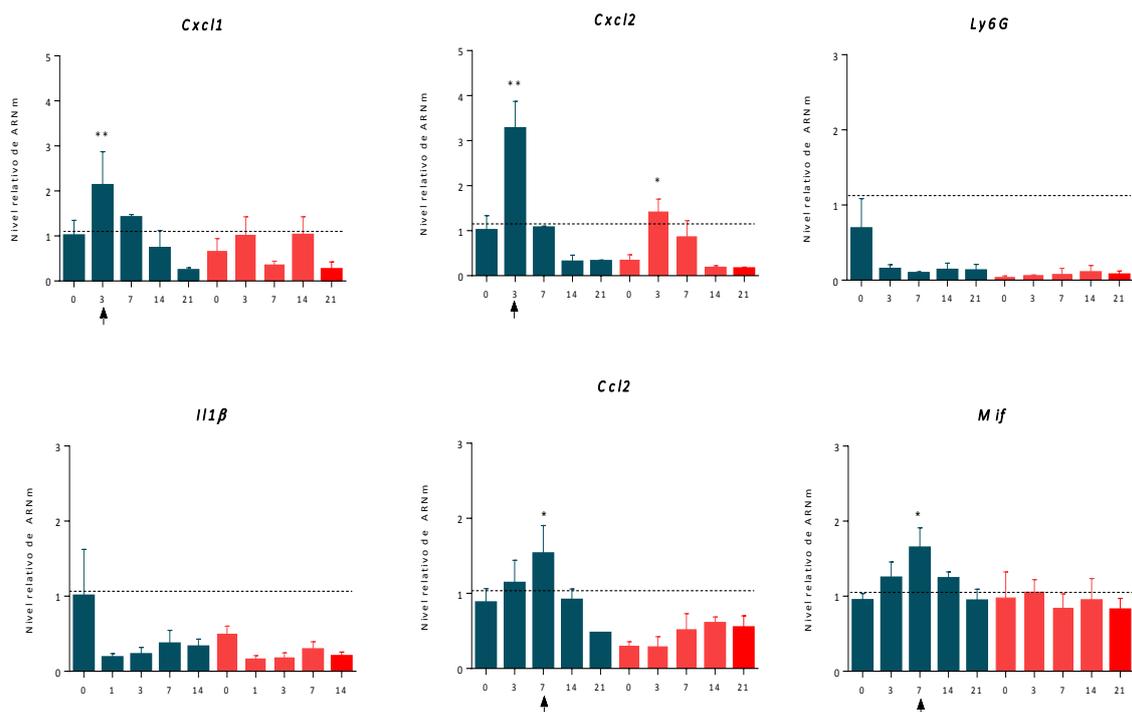
Nuestros resultados muestran que en el caso de la cepa salvaje el aumento de la expresión del mensajero de *Il10* e *Il4* se observó a los días 14 y 21 y ese aumento resultó significativo con respecto a su día cero. Esto coincide con el momento en el que la cepa salvaje elimina al neumococo de nasofaringe. Por otra parte la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*, presentó un aumento para estas interleuquinas a un tiempo más temprano, los días 3 y 7, y un máximo para *Il4*. A su vez, en estos tiempos la diferencia no sólo fue significativa con respecto a su día cero sino que también con respecto a la cepa salvaje.

En conjunto estos resultados y en combinación con los mostrados en la figura 4.9 sugieren que la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* generaría un entorno menos inflamatorio que la cepa salvaje, en respuesta a la colonización y esto podría ser una explicación de la colonización persistente que presentan. Y a su vez se ve un claro perfil de respuesta del tipo TH17 para la cepa salvaje, mientras que la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* muestra un perfil más de tipo TH2 o regulador de la respuesta inmune ya que muestra un aumento en los niveles de expresión de *Tgfb*, *Il2*, *Il10*, *Il4* a un tiempo más temprano en la cinética estudiada, días 3 y 7, y con valores superiores a los mostrados por la cepa salvaje en todos los puntos.

#### 4.4.2.2. Expresión de ARN mensajero de citoquinas reclutadoras y activadoras de células del sistema inmune.

A continuación fuimos a ver qué pasaba con la expresión de los mensajeros de quimioquinas que participan en el reclutamiento de neutrófilos y al sitio de infección como *Cxcl1*, *Cxcl2* (también conocida

como proteína inflamatoria de los macrófagos o MIP-2), así como también de *Il1β*, interleuquina pro inflamatoria producida mayoritariamente por macrófagos activados. Todos estos mediadores han sido consideradas importantes en la respuesta frente a infección con neumococo (Lemon, Miller, & Weiser, 2015b). Por otra parte está reportado en la bibliografía que los macrófagos juegan un rol importante en la eliminación de la colonización nasofaríngea neumocócica (Lemon et al., 2015a; Siegel et al., 2015a). Por un lado Weiser y su equipo de investigación sugieren que el factor inhibidor de la migración de macrófagos (macrophage migration inhibitory factor, MIF) es importante para la respuesta innata y adaptativa durante la colonización por *Streptococcus pneumoniae* (Das et al., 2013, 2014a). Esta sugerencia se basa en resultados obtenidos en ratones deficientes para MIF, *mif*<sup>-/-</sup>, inoculados por vía intranasal con cepas de neumococo de serotipo 6B (virulento) o 23F (no virulento). Los autores muestran que los animales deficientes para MIF presentan una colonización nasofaríngea más prolongada que los animales de la cepa salvaje. Por otro lado, también mostraron que una expresión reducida de la quimioquina *Ccl2* en los animales *mif*<sup>-/-</sup> (Das et al., 2014b).



**Figura 4.12.** Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de ARNm de *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ly6g*, *Il1β*, *Ccl2* y *Mif* en muestras de NALT de animales WT (azul) o *Il17α*<sup>-/-</sup> (rojo), obtenidas 0, 1, 3, 7, 14, o 21 días después la colonización con  $2 \times 10^4$  ufc/10  $\mu$ L de *S. pneumoniae* serotipo 1 (Pn1). Los niveles relativos de ARNm de cada gen fueron normalizados contra  $\beta$ -actina y relativizados con respecto al grupo control (día cero de la cepa salvaje). Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al día 0, dentro de una misma cepa. Las flechas indican diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto (Test de Man Whitney). Media  $\pm$  SEM de 6 animales por punto.

Por un lado *Cxcl1* y *Cxcl2*, mostraron una cinética de expresión similar en la cepa salvaje, con un aumento al día 3 que luego desciende gradualmente (Figura 4-12). Los niveles de expresión de estos mensajeros en el tiempo mencionado no solo mostraron una diferencia significativa con respecto a su día cero sino que también esa diferencia fue significativa con respecto a la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*. En ésta, *Cxcl1* se mantuvo en niveles basales mientras que *Cxcl2* mostró un aumento al día 3, que fue inferior al mostrado por la cepa salvaje, y luego la expresión disminuyó hacia el día 21. No se observó expresión de *Ly6g* ni de *Il1 $\beta$*  para ninguna de las dos cepas.

Por último, pudimos observar que los ratones salvajes presentaron un aumento significativo en los niveles relativos de ARNm de *Mif* al día 7, y este aumento fue significativamente superior tanto con respecto a su día cero como con respecto a los mostrados por la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*. Los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* no mostraron ningún incremento en los niveles relativos de ARNm de *Mif* a lo largo de toda la cinética. *Ccl2*, a su vez, en el caso de la cepa salvaje mostró una cinética muy similar a la observada para *Mif*. Se observó un aumento al día 7 que luego descendió, siendo este aumento significativamente superior a su día cero y a la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*; para esta última, los niveles de *Ccl2* se mantuvieron en sus niveles basales.

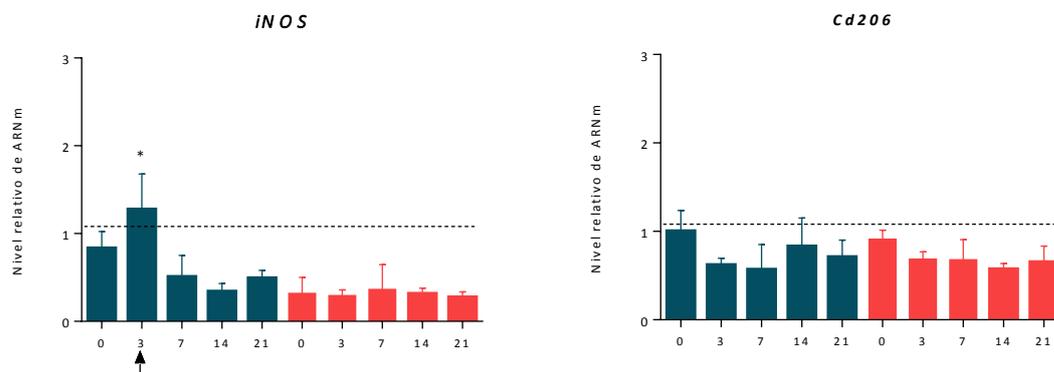
Lo que sugieren los datos de los genes analizados en la figura 4.11 es por un lado que el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección podría ser más eficiente, en tiempo de respuesta y en activación, en la cepa salvaje que en la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*. Y por otra parte que los niveles de expresión del ARNm de *Mif* y *Ccl2* se vieron más aumentados en la cepa salvaje y esto concuerda con lo publicado por Weisser, ya que en los ratones *Il17a<sup>-/-</sup>* no se observa incrementos en los niveles de *Mif*, ni tampoco de *Ccl2*, y también permanecen colonizados al igual que la cepa utilizada en el trabajo en donde los ratones *Mif<sup>-/-</sup>* presentaban una colonización persistente. Este resultado también concuerda con otro trabajo publicado en otro modelo de estudio en donde se demostró que el aumento en la expresión de *Il10* inhibe la síntesis de *Mif* (Jiayi Wu et al, 1993).

#### 4.2.2.3. Expresión relativa de genes implicados en la diferenciación de macrófagos hacia el perfil M1 o M2.

Para finalizar y teniendo en cuenta los niveles aumentados de ARNm de IL-4 mostrados por los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* (Figura 4.12), nos planteamos la hipótesis de que dicho aumento en IL-4, podría estar asociado a una mayor diferenciación de macrófagos hacia un fenotipo M2 en los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* y que esta pudiera ser una de las causas de la colonización persistente mostrada por estos. Para esto nos basamos en un trabajo realizado por Huang y colaboradores, en donde utiliza esta técnica para caracterizar a los

macrófagos M1 y M2 (Zhu, Zhao, Yang, Ding, & Zhao, 2015), describiendo genes que se expresan específicamente en uno u otro. Los autores describen que los macrófagos M1 presentan una mayor expresión de *Il1b*, *Il6*, *Il12*, *Il23*, *Ifn $\alpha$*  e *iNOS*, entre otros, y su función estaría asociada a la fagocitosis y eliminación de patógenos. Por otro lado, los macrófagos M2, presentan una mayor expresión de *Il13*, receptor de *Il1a*, *Il4*, *Il10* y el receptor de manosa, *Cd206*, entre otros. Se considera que estos macrófagos M2 tienen funciones reguladoras de la respuesta inmune, de reparación de tejidos lesionados.

Por todo esto, decidimos evaluar la expresión de *Cd206* e *iNOS* por qPCR para ambas cepas (Fig. 4.13)



**Figura 4.13.** Análisis por RT-qPCR de los niveles relativos de ARNm de *iNOS* y *Cd206* en muestras de NALT de animales WT (azul) o *Il17a<sup>-/-</sup>* (rojo), obtenidas 0, 3, 7 o 14 días después de la colonización con  $2 \times 10^4$  ufc/10  $\mu$ L de *S. pneumoniae* serotipo 1 (Pn1). Los niveles relativos de ARNm de cada gen fueron normalizados contra  $\beta$ -actina y relativizados con respecto al grupo control (día cero de la cepa salvaje). Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al día, dentro de una misma cepa. Las flechas indican diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto (Test de Man Whitney). Media  $\pm$  SEM de 6 animales por punto

En los datos mostrados en la figura 4.13, no se observaron diferencias significativas en los niveles relativos de ARNm de *Cd206*, a lo largo de toda la cinética, dentro de cada cepa, ni tampoco comparando entre ambos grupos. Sin embargo, en cuanto a *iNOS*, los animales salvajes presentaron un aumento significativo al día 3 que luego descendió a los valores presentados al día cero. La cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* no mostró ninguna modificación a lo largo de toda la cinética manteniéndose en los niveles basales de expresión. Previamente, se mostraron los gráficos para *Il-6*, *Il-12*, *Il-23* (Figura 4.9), que como se mencionó se asocian a macrófagos M1. Esos resultados mostraban una mayor expresión de éstos en los animales salvajes mientras que las citoquinas relacionadas con M2, IL-10 e IL-4, mostraron una mayor expresión para los animales *Il17a<sup>-/-</sup>*. Si bien no se observó ninguna diferencia significativa en el caso del receptor de manosa *Cd206*, sí se podría decir que *Inos* tiene una mayor expresión en la cepa salvaje.

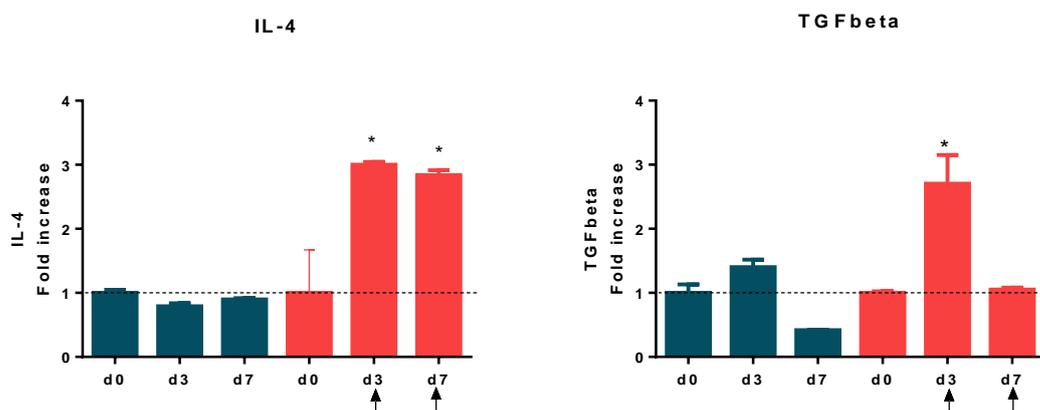
En su conjunto, estos resultados concuerdan con la hipótesis de que en la cepa salvaje los macrófagos podrían tener un perfil M1 en contraposición con la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>* en la que primaría un perfil M2. Nos

quedó pendiente ahondar en este punto. Resulta evidente que nuestro análisis se basa en la extracción de ARN del total de células presentes en NAL y que por tanto los niveles relativos de ARNm son un promedio de los distintos tipos celulares presentes en esas muestras, y no solo a los macrófagos. Sería interesante poder purificar por citometría los macrófagos de una y otra cepa (por ejemplo al día 7) y analizar la expresión de estos genes en la población purificada. El desafío aquí es la cantidad de células, ya que como se mencionará más adelante, es necesario realizar pools de muchos animales para obtener una cantidad suficiente. En el caso de querer realizar separación celular por citometría, podría ser esta una limitante.

#### 4.5. Detección de la producción de IL-4 y TGFβ por ELISA

Para confirmar los resultados obtenidos a nivel de ARNm, se decidió realizar la cuantificación, a nivel de proteína de algunas de las citoquinas analizadas, en particular IL-4, IL-10 y TGF-β, en muestras de lavado nasofaríngeo de animales WT e *Il17a<sup>-/-</sup>*, a los distintos tiempos luego de la colonización. En el caso de IL17A, también confirmamos su producción a nivel de proteína en el caso de los animales salvajes (datos no mostrados).

En el caso de IL-10, tuvimos varios inconvenientes con la técnica (problemas con los anticuerpos de captura y detección y con el standard) que impidieron poder obtener la cuantificación. Los resultados obtenidos para IL-4 y TGF-β se muestran en la Figura 4.14.



**Figura 4.14.** Cuantificación por ELISA de IL-4 (A) y TGFβ (B) en sobrenadantes de lavados nasofaríngeos de animales WT (azul) o *Il17a<sup>-/-</sup>* (rojo), obtenidos a los días 3 o 7 luego de la colonización con  $2 \times 10^4$  ufc/10μL de Pn1. Los resultados obtenidos en pg/mL se expresan en relación a los niveles basales para cada cepa (fold increase). Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al día 0, dentro de cada cepa. Las flechas indican diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto (Test de Man Whitney). Las barras representan la Media ± SEM de 6 animales por punto.

Los datos obtenidos para IL-4 fueron concordantes con lo mostrado a nivel de ARNm. Los animales *Il17a*<sup>-/-</sup> mostraron, tanto al día 3 como 7, un incremento de entre 2 y 3 veces con respecto a sus valores basales mientras que los animales de la cepa salvaje no mostraron ningún incremento en ninguno de los días analizados.

En el caso de TGF-beta, si bien ambas cepas mostraron un comportamiento similar, con una marcada disminución hacia el día 7, el incremento mostrado por la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> al día 3 fue significativamente mayor al mostrado por la cepa salvaje. Estos datos concuerdan con los observados a nivel de qPCR y permiten reafirmar nuestra hipótesis de que la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> presenta una repuesta temprana con un perfil más regulador de la inflamación frente a la colonización por neumococo lo que apoyaría la colonización persistente mostrada por ésta.

## 4.6. Análisis por citometría de flujo de distintas poblaciones celulares en respuesta a la colonización por neumococo.

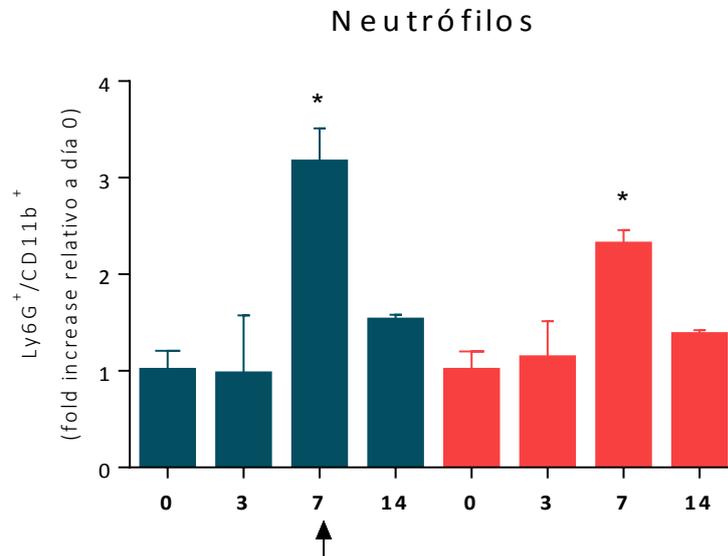
### 4.6.1. Evaluación de la población de neutrófilos Ly6G<sup>+</sup>/Cd11b<sup>+</sup>.

Una de las principales funciones descritas de IL-17A es el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección (Hamada et al., 2008; Xu & Cao, 2010) por lo que podría esperarse un menor reclutamiento de neutrófilos en la cepa deficiente para el gen *Il17a*.

Para evaluar las poblaciones celulares a nivel de nasofaringe, en la bibliografía se encuentran trabajos que utilizan las células obtenidas en los lavados nasofaríngeos así como también las muestras de NALT. Decidimos evaluar en los dos tipos de muestras encontrando algunas dificultades. Por un lado, en el caso de los lavados, la cantidad de células recuperadas era muy baja, por lo que fue necesario hacer un pool de al menos 8 animales por punto y por cepa.

Ambas cepas mostraron un comportamiento similar, con incremento significativo, al día 7, en la población de neutrófilos de NAL, con respecto al control (día 0), que luego disminuyó hacia el día 14 (Figura 4.15). Resulta interesante que la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> permanece colonizada, a pesar de tener un reclutamiento similar de neutrófilos al mostrado por la cepa salvaje, lo que sugiere que los neutrófilos no serían el tipo celular responsable de la eliminación de neumococo en nasofaringe. Un punto que hubiera sido interesante analizar tiene que ver con lo reportado por A Wang y colaboradores. Estos autores postularon, en un modelo de otitis media, que IL17A induce apoptosis de los neutrófilos, siendo este un mecanismo de defensa ante neumococo utilizado por el hospedero (W. Wang et al., 2014).

Podría haber sido interesante evaluar si la apoptosis de los neutrófilos era o no similar entre ambas cepas.



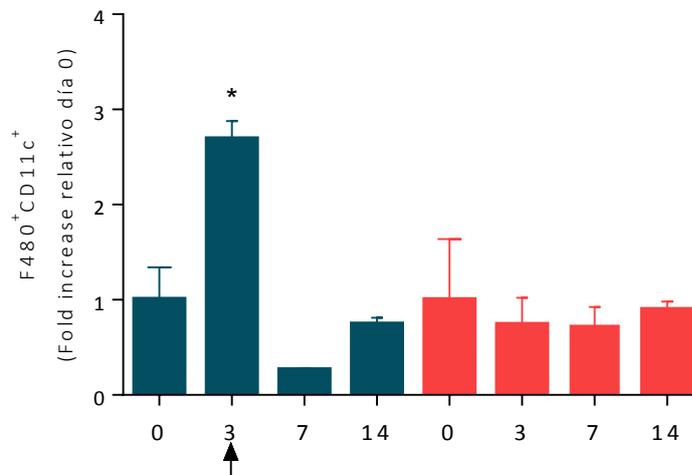
**Figura 4.15.** Análisis por citometría de flujo de la población de neutrófilos definidos con Ly6G<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> dentro de las células CD45<sup>+</sup>, utilizando 7AAD como marcador de viabilidad. Se analizaron muestras de NAL de animales WT (azul) o *Il17a*<sup>-/-</sup> (rojo) obtenidas 0, 3, 7 o 14 días luego de la colonización con 2x10<sup>4</sup>ufc/10μL de *S. pneumoniae* serotipo 1. Los resultados (% de células Ly6G<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup>) se expresan como fold increase en relación al promedio del día 0 de cada cepa. Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al día 0, dentro de cada cepa. Las flechas indican diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto \*, p<0.05, (Test de Man Whitney). Las barras representan la Media ± SEM de 4 pooles por punto y cada pool es de 8 animales.

#### 4.6.2. Evaluación de la población de macrófagos F4/80<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>.

Muchos trabajos científicos postulan a los macrófagos como la célula implicada en la primera línea de defensa frente a la infección por neumococo (Das et al., 2013; Siegel et al., 2015a) por lo cual nos interesó estudiar esta población durante la colonización por neumococo, en muestras NAL.

En el gráfico 4.16 se observa que al día 3 hay un aumento significativo en la población de macrófagos en los lavados nasofaríngeos para la cepa salvaje en comparación con su día cero, que luego disminuye a los siguientes tiempos evaluados. Los animales *Il17a*<sup>-/-</sup> no muestran variaciones significativas en la población de macrófagos totales a lo largo de los distintos tiempos analizados. En particular al día 3, los animales salvajes muestran una presencia de macrófagos totales significativamente mayor a la que presentan los *Il17a*<sup>-/-</sup>.

## Macrófagos

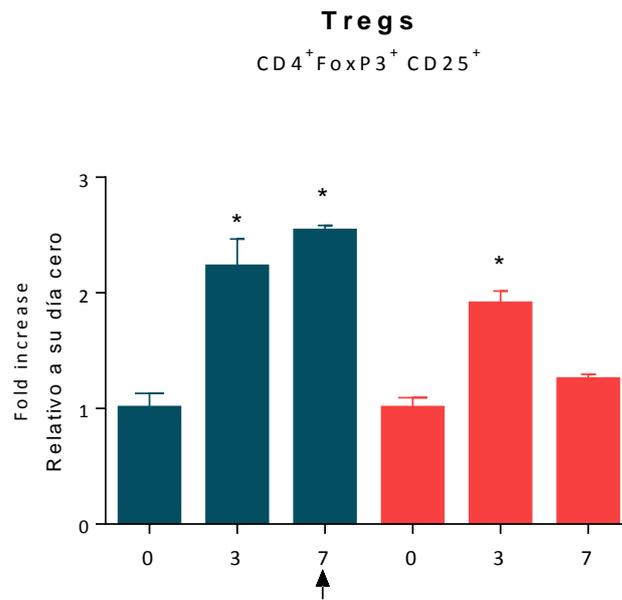


**Figura 4.16.** Análisis por citometría de flujo de la población de macrófagos definidos con  $F4/80^+/CD11c^+$  dentro de las células  $CD45^+$ , utilizando 7AAD como marcador de viabilidad. Se analizaron en muestras de NAL de animales WT (azul) o  $Il17a^{-/-}$  (rojo) obtenidas 0, 7 o 14 días luego de la colonización con  $2 \times 10^4$  ufc/10 $\mu$ L de *S. pneumoniae* serotipo. Los resultados (% de células  $F4/80^+ CD11c^+ CD45^+ 7AAD^-$ ) se expresan como fold increase en relación al promedio del día 0 de cada cepa. Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al día 0, dentro de cada cepa. Las flechas indican diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto \*,  $p < 0.05$ , (Test de Man Whitney). Las barras representan la Media  $\pm$  SEM de 4 pooles por punto y cada pool es de 8 animales.

La marcada diferencia en esta población celular apoya la hipótesis de que los macrófagos serían los responsables de la eliminación de la carga bacteriana de nasofaringe y que su falta de reclutamiento en la cepa  $Il17a^{-/-}$  estaría asociado a la imposibilidad de controlar y/o eliminar la carga bacteriana de nasofaringe.

#### 4.6.3. Evaluación de la población de células T reguladoras $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ .

Como ya se mencionó anteriormente, también está reportado que las células T reguladoras juegan un rol central durante la colonización (Mubarak et al., 2016; Pido-Lopez, Kwok, Mitchell, Heyderman, & Williams, 2011), por lo que también consideramos relevante estudiar este tipo celular en ambas cepas. Los resultados ya presentados y obtenidos por qPCR, sugerían que la cepa  $Il17a^{-/-}$  presenta un perfil de respuesta más regulador por lo que interesaba evaluar si esto estaba acompañado de una mayor presencia de células Tregs. Para esto, utilizamos únicamente muestras de NALT, e hicimos un pool de 10 ratones por cepa y por tiempo evaluado.



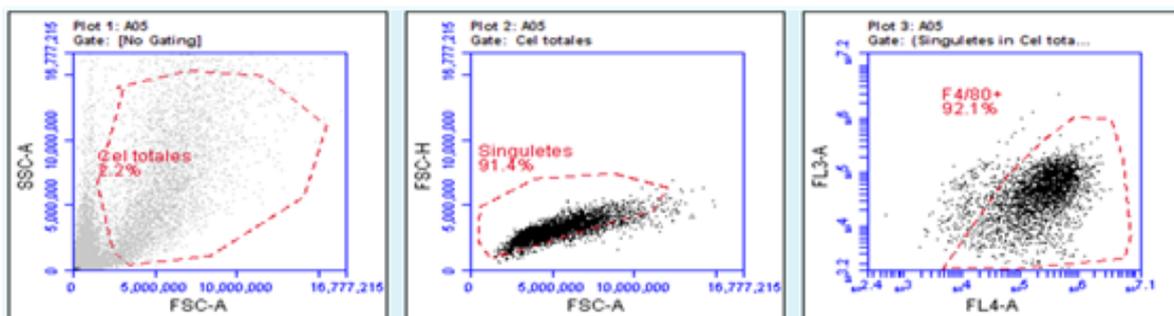
**Figura 4.17.** Análisis por citometría de flujo de la población de células Treg definidas como CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> dentro de las células CD4<sup>+</sup>. Se analizaron en muestras de NALT de animales WT (azul) o *Il17a*<sup>-/-</sup> (rojo) obtenidas 0, 3 o 7 días luego de la colonización con 2x10<sup>4</sup> ufc/10μL de *S. pneumoniae* serotipo 1. Los resultados (% de células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup>) se expresan como fold increase en relación al promedio del día 0 de cada cepa. Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al día 0, dentro de cada cepa. Las flechas indican diferencias significativas entre ambas cepas en ese punto\*, p<0.05, (Test de Man Whitney). Las barras representan la Media ± SEM de 4 pools por punto y cada pool es de 8 animales.

La cepa salvaje mostró un incremento significativo en la población de células identificadas como Tregs al día 3, que se mantuvo hacia al día 7, con respecto al control (día 0). En el caso de la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup>, se observó un aumento al día 3 que luego disminuyó al día 7. Contrariamente a lo esperado, la población de Tregs en los animales *Il17a*<sup>-/-</sup>, hacia el día 7, fue significativamente menor que lo mostrado por la cepa salvaje, lo que no apoya la hipótesis de que esta población estaría jugando un rol relevante en el control de la colonización. Esta publicado que las células T CD4<sup>+</sup> anti neumocóccicas son suficientes para eliminar la colonización y son las células TH17 las que hacen eficiente esta erradicación de la colonización. Cuando el ratio entre las células Th17/Treg es bajo, esto hace que la colonización persista. (Weiser et al 2018). Esto coincide con lo que sucede en la cepa salvaje en donde a tiempos tempranos se ve una respuesta de tipo TH17 muy superior a la respuesta generada por las células Treg. En el caso de la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup>, no se ve una respuesta de tipo TH1 o TH17 y sin embargo sí se observa un contexto regulador, lo que de alguna manera apoya lo publicado por Weiser.

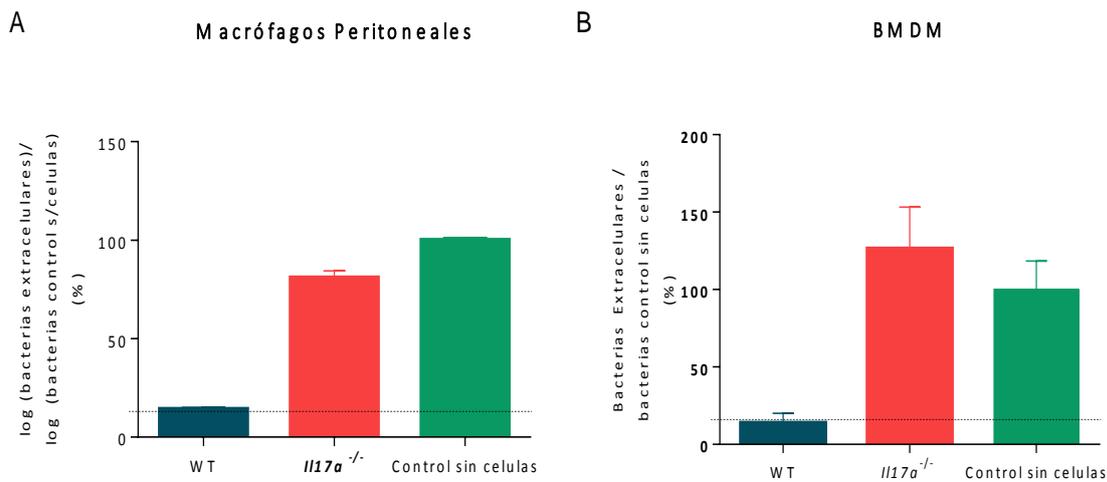
## 4.7. Evaluación de la capacidad bactericida de macrófagos peritoneales y derivados de médula ósea de ambas cepas de animales.

Los resultados obtenidos hasta ahora por qPCR muestran que para los animales *Il17a*<sup>-/-</sup> hay una expresión de los niveles de mensajeros de los genes relacionados con el perfil M2 de los macrófagos (*Il1a*, *Il4*, *Il10*) que es superior con respecto a la cepa salvaje. Y para el caso de esta última, se observó una mayor expresión del perfil M1 (*Il1β*, *Il6*, *Il12*, *Il23*, *ifnα*, *iNOS*). Por ELISA confirmamos que la producción de IL-4 era superior para la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> con respecto a los animales salvajes y que a su vez la producción de TGF-β se ve aumentada al día 3 para la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> con respecto a su nivel basal, situación que no se da en la cepa salvaje. Para hacer más completo el análisis, analizamos por citometría de flujo las poblaciones de células Treg. Vimos que tanto los animales salvajes como los *Il17a*<sup>-/-</sup> presentaban al día 3 un incremento en la población de células Tregs. Todo sugiere que la respuesta en los animales *Il17a*<sup>-/-</sup> se da en un contexto más regulador. Esto nos llevó a querer evaluar si en ese contexto los macrófagos tienen igual capacidad bactericida.

Realizamos ensayos preliminares, *in vitro*, utilizando macrófagos derivados de médula ósea así como también macrófagos peritoneales, en ambos casos obtenidos de animales salvajes e *Il17a*<sup>-/-</sup>. En esos ensayos, se evaluó la capacidad de los macrófagos en cultivo de fagocitar o eliminar un inóculo de Pn1, utilizando para esto una MOI de 1:100 (1 macrófago por cada 100 neumococos). Tanto los macrófagos provenientes de peritoneo como los diferenciados de médula ósea fueron caracterizados por citometría de flujo, confirmándose que todas las células expresaban el marcador F4/80<sup>+</sup>, característico de macrófagos de ratón.



**Figura 4.18.** Confirmación por citometría de flujo de la población de macrófagos derivados de médula ósea utilizando como marcador de los mismos F4/80 en APC. Las muestras fueron analizadas en el citómetro Accuri C6 del Institut Pasteur de Montevideo. Se utilizó el detector FL4 y el filtro 675/25 nm.



**Figura 4.19.** Recuento de unidades formadoras de colonias de Pn1 en el sobrenadante de cultivo de macrófagos peritoneales (A) o derivados de médula ósea (B) 4h luego de la infección con *S. pneumoniae* serotipo 1, a una MOI 1:100. En azul se representan los recuentos de Pn1 en el sobrenadante de células obtenidas de animales WT, en rojo los de animales *Il17a*<sup>-/-</sup> y en verde los recuentos correspondientes al control del cultivo bacteriano, en ausencia de células. \*,  $p < 0.05$ , (Test de Man Whitney). Las barras representan la Media  $\pm$  SEM de 3 experimentos para los cuales se utilizaron 3 animales por cepa.

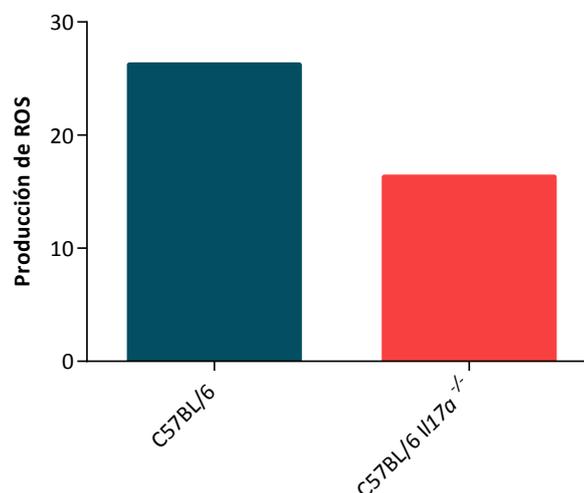
Luego de 4h de co-cultivo macrófagos y Pn1, se realizó el recuento de las bacterias en el sobrenadante, comparando contra pocillos que solo contenían las bacterias (sin células). En el caso de las células aisladas de peritoneo (Figura 4.19- A), vimos que aquellas provenientes de la cepa salvaje eliminaron por completo a la bacteria, dado que no se detectaron bacterias en el sobrenadante a las 4h de cultivo. Por el contrario, en el sobrenadante de los cultivos de células provenientes de animales *Il17a*<sup>-/-</sup> se observaron recuentos que fueron incluso superiores a los obtenidos en el caso de los pocillos que solo contenían bacterias (control sin células). Además, a pesar de que se realizaron los recuentos de las células lisadas, no fue posible detectar bacterias viables intracelulares en ninguno de los ensayos realizados.

Para los macrófagos derivados de médula ósea (Figura 4.19- B) sucedió lo mismo. En el caso de los macrófagos de la cepa salvaje la cantidad de bacterias extracelulares, pasadas 4h de co-cultivo, fue significativamente menor (2 órdenes menor) al mostrado en el control de bacterias solas (sin células). En el caso de los macrófagos de los animales *Il17a*<sup>-/-</sup>, no se observó dicha disminución, sino que por el contrario los valores fueron iguales o incluso superiores a los mostrados por el control.

Este resultado es muy interesante y confirma nuestra hipótesis planteada en un comienzo en donde vemos que la capacidad bactericida de los macrófagos, ya sea los diferenciados de médula ósea o los provenientes del peritoneo, de la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> serían menos eficientes que los de la cepa salvaje en controlar una carga de Pn1.

## 4.8. Evaluación de la producción de ROS por parte de los macrófagos peritoneales.

El estallido respiratorio o explosión respiratoria (conocido también como estallido o explosión oxidativa) es el proceso donde algunas células son capaces de producir y liberar especies reactivas de oxígeno y peróxido de hidrógeno (Marriott, Hellewell, Whyte, & Dockrell, 2007). En un trabajo publicado recientemente mostraron que ratones deficientes en ATF3 ( $ATF3^{-/-}$ ) mostraron una reducción marcada en la expresión IL-17A en comparación con los niveles producidos en ratones salvajes. Además, como resultado de la interrupción de la homeostasis celular de ROS y  $Ca^{2+}$ , la producción de IL-1 $\beta$  mitocondrial por macrófagos derivados de la médula ósea se redujo significativamente en ratones  $ATF3^{-/-}$ . En consecuencia, estos ratones mostraron una disminución de la supervivencia y en la eliminación de la carga bacteriana luego de ser infectados por *S. pneumoniae* (Lee et al., 2018). En línea con esto, decidimos evaluar el estallido respiratorio generado en macrófagos aislados del peritoneo de ambas cepas de animales, en co-cultivo con Pn1 (MOI de neumococo de 100), por citometría de flujo utilizando dihidroetidina. En condiciones en las que se da el estallido respiratorio, se genera el anión superóxido, que reacciona con la dihidroetidina produciendo etidio que se intercala en el ADN emitiendo fluorescencia en otro canal. Por tanto, la intensidad de fluorescencia en este canal se asocia a la producción de especies reactivas del oxígeno.



**Figura 4.20.** Evaluación por citometría de flujo de ROS utilizando macrófagos aislados de la cavidad peritoneal de la cepa salvaje (azul) y de la cepa  $Il17a^{-/-}$  (rojo). Los macrófagos fueron expuestos a una MOI de 100 de Pn1 durante media hora. Luego fueron marcados como F4/80+/CD11C+ y la evaluación de ROS se vio a través de la conversión dihidroetidina a etidio se da por el anión superóxido y esto se ve en el canal de Percp.

Los resultados obtenidos en esta primera instancia mostrados en la figura 4.20, sugieren una tendencia hacia un mayor estallido respiratorio en el caso de los macrófagos salvajes, con respecto los *Il17a<sup>-/-</sup>*. De todos modos, se trató de un ensayo muy preliminar habiendo quedado pendiente su repetición como parte de las perspectivas.

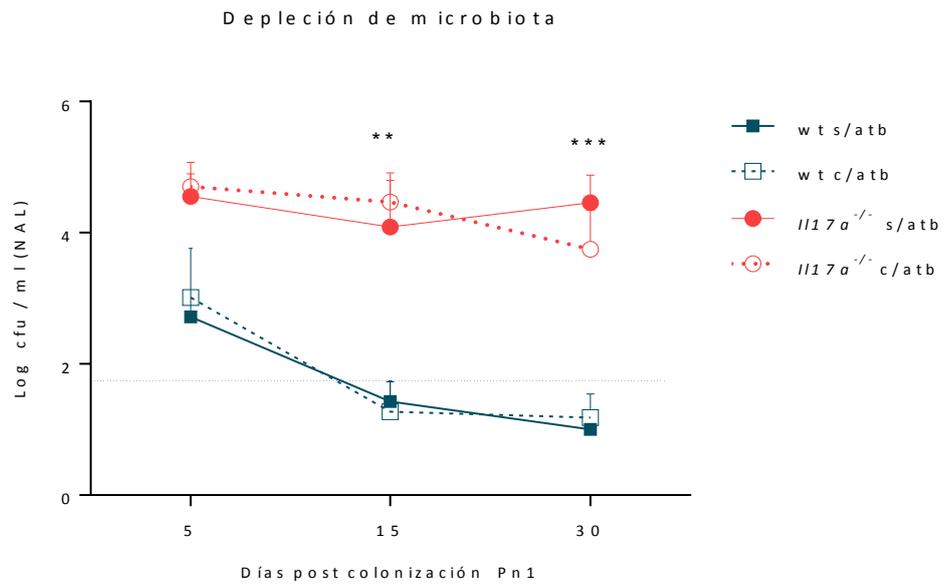
## 4.9. Depleción de la microbiota intestinal en ambas cepas de animales.

Trabajos publicados por el grupo de Ritchie mostraron que, en un modelo de colonización nasofaríngea por neumococo en animales deficientes para el receptor de IL17A, la falta de señalización de IL-17 condujo a profundas alteraciones en el microbioma nasal lo que derivó en un aumento de la colonización neumocócica en nasofaringe (Ritchie et al., 2017). A su vez otro trabajo mostró que la microbiota intestinal mejoraría la función del macrófago alveolar primario (Schuijt et al., 2016a).

De esta manera quisimos ver qué sucedía en nuestro modelo de colonización nasofaríngea cuando depletábamos la microbiota intestinal. Se trata de un ensayo muy preliminar, en el cual, decidimos repetir el procedimiento empleado por otros autores para modificar la microbiota intestinal, mediante el cual los animales son tratados por 3 días con un cocktail de antibióticos. En este ensayo, no fue posible evaluar la disminución de la carga bacteriana, si bien se guardaron muestras de heces para eventualmente poder realizar la secuenciación por 16S. A continuación, tanto los animales salvajes o *Il17a<sup>-/-</sup>*, tratados o sin tratar con antibióticos, recibieron la dosis colonizante de Pn1 y se evaluó la carga bacteriana en nasofaringe a distintos tiempos.

Los resultados mostraron que tanto la cepa salvaje con el tratamiento de antibióticos, como la cepa salvaje sin tratamiento, eliminaron la colonización nasofaríngea siguiendo exactamente la misma cinética de eliminación de carga bacteriana. Lo mismo sucedió con la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*, tanto la tratada como la no tratada, permanecieron colonizadas en el tiempo de manera persistente (Figura 4.21).

Estos resultados no permiten confirmar ni descartar nuestra hipótesis, ya que hasta ahora no pudimos confirmar que el tratamiento haya afectado la microbiota, tanto intestinal como a nivel de nasofaringe. De todos modos, el hecho de no haber encontrado diferencias en los animales tratados con antibiótico resultaron desalentadores a seguir por este camino pero creemos que deberíamos repetirlo, completando el análisis de heces y tal vez agregando muestras de NAL, por secuenciación para confirmar o no la depleción de la microbiota.



**Figura 4.21** Cinética de carga bacteriana detectada en lavados nasofaríngeos 5, 15, 21 y 30 días después de una dosis subletal ( $2 \times 10^4$  ufc/ $10 \mu\text{l}$ ) de *S. pneumoniae* serotipo 1. En animales depletados de microbiota (línea punteada y símbolo vacío) y animales con microbiota normal (línea llena y símbolo lleno) La línea punteada en negro corresponde al límite de detección de la metodología utilizada (Test de Man Whitney). Media  $\pm$  SEM de 5 animales por grupo.

## Capítulo 5. Discusión general

En este proyecto de maestría nuestro objetivo fue abordar la investigación desde tres frentes que consideramos fundamentales para una respuesta efectiva contra un patógeno, en este caso neumococo. Estos son la respuesta humoral, la respuesta a nivel transcripcional y a nivel celular. Partimos de un resultado clave como lo fue la determinación del rol esencial que cumple IL-17A en la eliminación de la carga bacteriana de nasofaringe. En función de ese resultado también nos propusimos ahondar en los posibles roles que podría tener esta citoquina por ejemplo en la generación de anticuerpos o en el reclutamiento de las distintas poblaciones celulares.

Lo primero que evaluamos fue por un lado cómo era la respuesta de anticuerpos, IgM, IgG e IgA, frente a la colonización por Pn1 y por otro lado, si la ausencia de *Il17a* modificaba de alguna manera esta respuesta. Confirmamos que la colonización por Pn1 induce una respuesta humoral sistémica y a nivel local (lavados nasofaríngeos), específica contra el polisacárido capsular del serotipo 1. Se observó, en todos los casos, un incremento en los niveles de anticuerpos para ambas cepas, tanto en muestras de lavados nasofaríngeos como en muestras de suero. Por un lado, pudimos concluir que la ausencia de IL-17A no estaría influyendo en la capacidad de generar anticuerpos contra el polisacárido capsular del serotipo 1. Sin embargo, con respecto a la respuesta frente al Ps-C, la cepa salvaje mostró un aumento en la producción de estos anticuerpos, pero en el caso de la cepa deficiente para *Il17a* no hubo respuesta de IgG y por ende tampoco de sus subclases, lo que sugiere que la ausencia de IL17A estaría interfiriendo en la producción de estos anticuerpos.

Por otra parte, mostramos que la depleción sostenida de células CD4<sup>+</sup> modificó la respuesta humoral inducida frente a la colonización, observándose una disminución significativa en los niveles de anticuerpos IgG e IgM específicos contra el polisacárido capsular, además de un retraso en la eliminación de la carga bacteriana en nasofaringe. Estos datos sugieren que las células CD4<sup>+</sup> estarían colaborando en la producción temprana (antes de los 7 días) de anticuerpos específicos contra el polisacárido capsular. Además, el retraso en la eliminación de la carga sugiere que estas células participan de la respuesta encargada del control de la colonización por Pn1, lo cual concuerda con resultados presentados por otros grupos de investigación (Lu et al., 2008; Malley et al., 2005; Roche et al., 2007).

Por otra parte, nos resultó interesante tener una primera aproximación de cómo es la respuesta a nivel transcripcional, dirigiendo este análisis desde distintos ángulos. Por un lado, nos interesó enfocarnos

en genes asociados a los distintos perfiles de respuesta de las células T. Algunos autores establecen que la respuesta frente a la protección contra la colonización nasofaríngea o frente a la neumonía neumocócica es de tipo TH17 (Cohen et al., 2011a, 2011b; Marqués et al., 2012a; Moffitt et al., 2011; Olliver, Bergman et al., 2011). Nuestros resultados apoyan esos trabajos, ya que mostramos que la respuesta frente a la colonización, en la cepa salvaje, presentó un perfil Th17, con incrementos en la expresión relativa de *Il17a*, *Il17f*, *Rorgt*, *Il22*, *Il23*, entre otros. A su vez, también mostramos, en la cepa salvaje, la activación de una respuesta pro-inflamatoria dada por el aumento en la expresión relativa de mensajeros implicados en el reclutamiento de neutrófilos y en la activación de macrófagos, así como también el incremento en la expresión relativa de péptidos antimicrobianos. Por el contrario, en la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> se indujo una respuesta con un perfil que consideramos más de tipo regulador, dado por un aumento en la expresión relativa más temprana (ya desde el día 3) de genes como *Tgfb*, *Il10* o *Il4*, así como una ausencia de incrementos en los genes asociados con respuestas Th17 (a excepción de *Il17f* que mostró un comportamiento de tipo compensatorio) como *Il17a*, *Il22*, *Il23* o *Il6*. Además, si bien en los animales WT se observó también el aumento en la expresión de genes asociados a respuestas Th1 (*Ifng*, *Il12*), los animales *Il17a*<sup>-/-</sup> no mostraron ningún incremento a ninguno de los tiempos analizados. En suma, creemos que estos datos apoyan la hipótesis de que las diferencias en el entorno de citoquinas y mediadores inducidos a nivel de nasofaringe en respuesta a la colonización por neumococo entre las diferentes cepas estarían asociadas con el control o no de la carga bacteriana. Esto es, que un perfil de tipo Th17/Th1 se asocia con el control de la colonización, mientras que un perfil Th2/Treg, inducido de manera temprana, estaría asociado a la colonización persistente. Además, que *Il17f* por sí sola, si bien se sabe comparte funciones con *Il17a*, no sería suficiente, ya que en los animales *Il17a*<sup>-/-</sup> sí se induce su expresión y de manera temprana, pero igual permanecen colonizados. Se ha descrito que la presencia de células Treg favorecería la persistente colonización de neumococo en nasofaringe (Jiang et al., 2015). A nivel transcripcional, nos interesó entonces evaluar la expresión relativa del factor de transcripción clave que es *Foxp3*, que mostró estar aumentado al día 14 en las dos cepas, sin diferencias entre ambas. Por otro lado, otros autores han mostrado que la presencia de TGFβ e IL10 favorecen la diferenciación o reclutamiento de Tregs al sitio de infección, generando un ambiente regulador del cual el neumococo se aprovecha para permanecer en nasofaringe e intentar invadir otros sitios cercanos (D. R. Neill et al., 2014b). Nuestros datos a nivel de ARNm apoyan esto, ya que los animales *Il17a*<sup>-/-</sup> mostraron una respuesta temprana, con incrementos en los niveles relativos de *Il4* e *Il10* desde el día 3, mientras que en los WT solo se observan incrementos menores y recién al día 14. Mediante ELISA, pudimos confirmar a nivel de proteína, que en la cepa *Il17a*<sup>-/-</sup> se indujo un aumento significativo en los niveles de IL-4 y TGFβ (relativos al día 0) a tiempos tempranos, mientras

que en la cepa salvaje no se observaron incrementos relativos a ninguno de los 2 tiempos analizados (día 3 y día 7 post colonización).

Otro ángulo que queríamos cubrir era ver qué sucedía con la producción del factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF), que como describimos anteriormente, está reportado que animales deficientes para MIF tienen una colonización nasofaríngea más prolongada que los animales de la cepa salvaje (Das et al., 2014b). Nuestros resultados mostraron aumentada la expresión de estos dos genes en la cepa salvaje y no en la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*. Se ha reportado que existe una relación entre la producción de IL-17A y MIF, en donde se muestra que en ratones *mif<sup>-/-</sup>* la producción de Il17a se ve notoriamente disminuida (Stojanović, Cvjetičanin, Lazaroski, Stošić-Grujičić, & Miljković, 2009). Sin embargo, nuestros datos muestran una ausencia total de expresión de Mif en el caso de los animales *Il17a<sup>-/-</sup>*, lo cual no ha sido reportado aún y que de algún modo apoya lo planteado por Das y colaboradores, resaltando el rol de Mif en el control de la colonización.

En vista de estos resultados obtenidos con respecto a los macrófagos, en donde vimos que las citoquinas que producen los mismos y las citoquinas que los activan, se ven incrementadas en la cepa salvaje y no en la *Il17a<sup>-/-</sup>*, quisimos ver si esto se acompañaba de una expresión diferencial de genes asociados al perfil M1 o M2 de los macrófagos, esto es iNOS y CD206, respectivamente (Y.-H. Zhang, He, Wang, & Liao, 2017). Si bien no se encontraron diferencias en la expresión relativa del receptor de manosa CD206 entre las dos cepas de ratones, sí se encontraron diferencias en el caso de iNOS, siendo significativamente superiores en el caso de la cepa salvaje, lo que podría apoyar la hipótesis de que los macrófagos salvajes presentes durante la colonización por Pn1 podrían tener un perfil M1.

A continuación, utilizamos la citometría de flujo como técnica que nos permite hacer un análisis multiparamétrico y de esta manera definir distintas poblaciones celulares en tejidos de nasofaringe. Demostramos que existe igual reclutamiento de neutrófilos en ambas cepas. Es decir, que si bien la respuesta frente a la colonización incluye el reclutamiento de neutrófilos que podrán colaborar en la eliminación de las bacterias presentes en nasofaringe mediante opsonofagocitosis (ya que sabemos hay anticuerpos anti capsula presentes), éstos no serían el tipo celular clave a la hora de erradicar al neumococo de nasofaringe, ya que igualmente los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* permanecen colonizados. Este resultado también nos mostró que el hecho de que la cepa *Il17a<sup>-/-</sup>*, carezca obviamente del gen que codifica para *Il17a*, no implica que otros mediadores como puede ser *Il17f*, u otros mediadores pro-inflamatorios, compensen dicha ausencia y permitan que igual se dé el reclutamiento de este tipo celular, confirmando la redundancia del sistema inmune. En cuanto a las células Tregs, los resultados obtenidos por citometría no correlacionan con los datos obtenidos por qPCR. Si bien, hubiéramos esperado una mayor presencia de células Tregs en los animales *Il17a<sup>-/-</sup>*, el comportamiento observado

podría estar asociado a la ausencia de una respuesta pro-inflamatoria fuerte en éstos, que entonces no dispara la respuesta reguladora. En ese sentido, en los animales salvajes en los que sí se induce una respuesta pro-inflamatoria temprana focalizada en controlar la carga bacteriana en nasofaringe, la presencia de Tregs hasta el día 7 (último punto analizado) podría tener la función de “apagar” o disminuir el proceso inflamatorio.

Por último, el resultado más esclarecedor obtenido con esta técnica fue observar la presencia mayoritaria en un tiempo temprano de macrófagos en el sitio de infección. Esta diferencia fue significativamente superior para la cepa salvaje, lo que resalta el rol de los macrófagos en la eliminación de la colonización.

Además de mostrar un menor reclutamiento de macrófagos, creemos que el ambiente de citoquinas mostrado por los animales *Il17a<sup>-/-</sup>*, podría determinar que los macrófagos presentes no sean tan efectivos a la hora de eliminar el neumococo, posiblemente por una tendencia hacia un perfil M2. Fue así que decidimos evaluar la capacidad bactericida de macrófagos diferenciados a partir de precursores de médula ósea y macrófagos aislados de la cavidad peritoneal, frente a una infección in vitro con Pn1. Nuestros resultados mostraron que los macrófagos provenientes de cavidad peritoneal así como los diferenciados a partir de precursores de médula ósea (BMDM) de animales salvajes, eliminaban por completo o parcialmente, respectivamente, a la bacteria, mientras que aquellos provenientes de animales *Il17a<sup>-/-</sup>* mantenían recuentos similares a los del control de bacterias sin células. Este resultado es clave, ya que sería nuestra primera aproximación al rol de la IL17A en la colonización por neumococo. Más allá de que no hemos podido detectar aún el mecanismo fino o la ruta por la cual esta citoquina colabora en la diferenciación de los macrófagos hacia el perfil M1.

## Capítulo 6. Conclusión general

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados obtenidos lo primero que podemos concluir es que IL17A es esencial para eliminar la colonización neumocócica de nasofaringe. Este resultado se evidencia al ver que los animales deficientes para esta citoquina permanecen colonizados en el tiempo. A su vez este resultado se ve reforzado cuando, mediante el agregado de IL17A recombinante a animales *Il17a<sup>-/-</sup>*, se restablece el fenotipo salvaje y los animales eliminan la colonización.

Por otra parte nuestros resultados descartan la hipótesis de que IL-17A está involucrada en la producción de anticuerpos, al menos en lo que refiere al polisacárido capsular de tipo 1, ya que ambas cepas presentan una respuesta humoral similar.

Desde el punto de vista celular, si bien IL17A es por definición una citoquina reclutadora de neutrófilos, en este caso su ausencia no afectaría el reclutamiento de los mismos al sitio de infección, lo que por otra parte nos indica que los neutrófilos no estarían siendo suficientes para eliminar la colonización. Por el contrario, se observó una diferencia clave en el reclutamiento de los macrófagos siendo este mayor en la cepa salvaje. A su vez, el perfil transcripcional de los animales *Il17a<sup>-/-</sup>* es predominantemente regulador y apoya la hipótesis de que hay una tendencia de los macrófagos de esta cepa hacia una diferenciación de perfil M2. Consecuentemente se vio *in vitro* que los macrófagos derivados de médula ósea o de cavidad peritoneal de animales *Il17a<sup>-/-</sup>* fueron incapaces de combatir a neumococo mientras que los macrófagos de la cepa salvaje lo hicieron de manera eficiente. Este resultado sugiere que IL17A estaría implicada de alguna manera en la diferenciación de los macrófagos hacia el perfil M1, lo cual abre una línea de investigación para seguir dilucidando el rol de esta citoquina en la resolución de la infección frente a este patógeno.

## Capítulo 7. Referencias Bibliográficas

- Abuka, T. (n.d.). Prevalence of pneumonia and factors associated among children 2-59 months old in Wondo Genet district, Sidama zone, SNNPR, Ethiopia. Retrieved from [www.currentpediatrics.com](http://www.currentpediatrics.com)
- Albiger, B., Dahlberg, S., Sandgren, A., Wartha, F., Beiter, K., Katsuragi, H., ... Henriques-Normark, B. (2007). Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cellular Microbiology*, *9*(3), 633–44. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00814.x>
- Albiger, B., Sandgren, A., Katsuragi, H., Meyer-Hoffert, U., Beiter, K., Wartha, F., ... Normark, B. H. (2005). Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. *Cellular Microbiology*, *7*(11), 1603–15. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00578.x>
- Avadhanula, V., Rodriguez, C. A., Devincenzo, J. P., Wang, Y., Webby, R. J., Ulett, G. C., & Adderson, E. E. (2006). Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *Journal of Virology*, *80*(4), 1629–36. <http://doi.org/10.1128/JVI.80.4.1629-1636.2006>
- Barbi, J., Pardoll, D., & Pan, F. (2013). Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunological Reviews*, *252*(1), 52–77. <http://doi.org/10.1111/imr.12029>
- Basset, A., Thompson, C. M., Hollingshead, S. K., Briles, D. E., Ades, E. W., Lipsitch, M., & Malley, R. (2007). Antibody-independent, CD4+ T-cell-dependent protection against pneumococcal colonization elicited by intranasal immunization with purified pneumococcal proteins. *Infection and Immunity*, *75*(11), 5460–4. <http://doi.org/10.1128/IAI.00773-07>
- Bäumler, A. J., & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, *535*(7610), 85–93. <http://doi.org/10.1038/nature18849>
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., ... Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, *441*(7090), 235–238. <http://doi.org/10.1038/nature04753>
- Bjarnarson, S. P., Jakobsen, H., Del Giudice, G., Trannoy, E., Siegrist, C.-A., & Jonsdottir, I. (2005). The advantage of mucosal immunization for polysaccharide-specific memory responses in early life. *European Journal of Immunology*, *35*(4), 1037–45. <http://doi.org/10.1002/eji.200425850>
- Bogaert, D., Groot, R. De, & Hermans, P. W. M. (2004a). Streptococcus pneumoniae colonisation Streptococcus pneumoniae colonisation : the key to pneumococcal disease, *4*(March), 144–154.
- Bogaert, D., Groot, R. De, & Hermans, P. W. M. (2004b). Streptococcus pneumoniae colonisation Streptococcus pneumoniae colonisation : the key to pneumococcal disease, *4*(March), 144–155.
- Bogaert, D., Thompson, C. M., Trzcinski, K., Malley, R., & Lipsitch, M. (2010). The role of complement in innate and adaptive immunity to pneumococcal colonization and sepsis in a murine model. *Vaccine*, *28*(3), 681–5. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.085>
- Bogaert, D., Weinberger, D., Thompson, C., Lipsitch, M., & Malley, R. (2009). Impaired innate and adaptive immunity to Streptococcus pneumoniae and its effect on colonization in an infant mouse model. *Infection and Immunity*, *77*(4), 1613–22. <http://doi.org/10.1128/IAI.00871-08>

- Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them. *Journal of Visualized Experiments*, (36). <http://doi.org/10.3791/1724>
- Camou, T. (2018). Colonización nasofaríngea por serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en niños uruguayos antes y después de la introducción de las vacunas antineumocócicas conjugadas Nasopharyngeal colonization from *Streptococcus pneumoniae* serotypes, (November). <http://doi.org/10.31134/ap.89.4.2>
- Carapetis, J. R., Steer, A. C., Mulholland, E. K., & Weber, M. (2005). The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(11), 685–694. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70267-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70267-X)
- Chang, S. H., & Dong, C. (2009). IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine*, 46(1), 7–11. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.12.024>
- Charalambous, B. M., & Leung, M. H. (2012). Pneumococcal sepsis and nasopharyngeal carriage. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 18(3), 222–7. <http://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328352103b>
- Chen, K., & Kolls, J. K. (2017). Interleukin-17A (IL17A). *Gene*, 614, 8–14. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2017.01.016>
- Cohen, J. M., Khandavilli, S., Camberlein, E., Hyams, C., Baxendale, H. E., & Brown, J. S. (2011a). Protective contributions against invasive *Streptococcus pneumoniae* pneumonia of antibody and Th17-cell responses to nasopharyngeal colonisation. *PLoS One*, 6(10), e25558. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025558>
- Cohen, J. M., Khandavilli, S., Camberlein, E., Hyams, C., Baxendale, H. E., & Brown, J. S. (2011b). Protective contributions against invasive *Streptococcus pneumoniae* pneumonia of antibody and Th17-cell responses to nasopharyngeal colonisation. *PLoS One*, 6(10), e25558. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025558>
- Colebatch, H. J., & Ng, C. K. (n.d.). Estimating alveolar surface area during life. *Respiration Physiology*, 88(1–2), 163–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1626135>
- Coury, F., Annels, N., Rivollier, A., Olsson, S., Santoro, A., Speziani, C., ... Delprat, C. (2008). Langerhans cell histiocytosis reveals a new IL-17A-dependent pathway of dendritic cell fusion. *Nature Medicine*, 14(1), 81–7. <http://doi.org/10.1038/nm1694>
- Craig, A., Mai, J., Cai, S., & Jeyaseelan, S. (2009). Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infection and Immunity*, 77(2), 568–75. <http://doi.org/10.1128/IAI.00832-08>
- Cua, D. J., & Tato, C. M. (2010). Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 479–489. <http://doi.org/10.1038/nri2800>
- Da Silva, C. A., Hartl, D., Liu, W., Lee, C. G., & Elias, J. A. (2008). TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(6), 4279–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768886>
- Das, R., Koo, M.-S., Kim, B. H., Jacob, S. T., Subbian, S., Yao, J., ... Bucala, R. (2013). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), E2997–3006. <http://doi.org/10.1073/pnas.1301128110>
- Das, R., LaRose, M. I., Hergott, C. B., Leng, L., Bucala, R., & Weiser, J. N. (2014a). Macrophage migration inhibitory factor promotes clearance of pneumococcal colonization. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(2), 764–72. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1400133>

- Das, R., LaRose, M. I., Hergott, C. B., Leng, L., Bucala, R., & Weiser, J. N. (2014b). Macrophage migration inhibitory factor promotes clearance of pneumococcal colonization. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *193*(2), 764–72. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1400133>
- DÍAZ\*, E. J. C. J. S. L. G. M. T. R. E. S. D. (2009). Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, *22*(4), 366–378.
- Dickson, R. P., & Huffnagle, G. B. (2015). The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathogens*, *11*(7), e1004923. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004923>
- Dorrington, M. G., Roche, A. M., Chauvin, S. E., Tu, Z., Mossman, K. L., Weiser, J. N., & Bowdish, D. M. E. (2013). MARCO is required for TLR2- and Nod2-mediated responses to *Streptococcus pneumoniae* and clearance of pneumococcal colonization in the murine nasopharynx. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(1), 250–8. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1202113>
- Durant, L., Watford, W. T., Ramos, H. L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., ... O'Shea, J. J. (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*, *32*(5), 605–15. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.003>
- Edin, A., Granholm, S., Koskiniemi, S., Allard, A., Sjöstedt, A., & Johansson, A. (2015). Development and laboratory evaluation of a real-time PCR assay for detecting viruses and bacteria of relevance for community-acquired pneumonia. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, *17*(3), 315–24. <http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.01.005>
- Engholm, D. H., Kilian, M., Goodsell, D. S., Andersen, E. S., & Kjærgaard, R. S. (2017). A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(6), 854–879. <http://doi.org/10.1093/femsre/fux037>
- Foro de las Sociedades Respiratorias Internacionales El impacto mundial de la Enfermedad Respiratoria.* (n.d.). Retrieved from [https://www.who.int/gard/publications/The\\_Global\\_Impact\\_of\\_Respiratory\\_Disease\\_ES.pdf](https://www.who.int/gard/publications/The_Global_Impact_of_Respiratory_Disease_ES.pdf)
- Gaffen S.L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 556–567.
- Ghaffar, F., Friedland, I. R., & McCracken, G. H. (1999). Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *18*(7), 638–46.
- Ghaffar, F., Muniz, L. S., Katz, K., Smith, J. L., Shouse, T., Davis, P., & McCracken, G. H. (2002). Effects of large dosages of amoxicillin/clavulanate or azithromycin on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, nonpneumococcal alpha-hemolytic streptococci, and *Staphylococcus aureus* in children with acute otitis media. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *34*(10), 1301–9. <http://doi.org/10.1086/340054>
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C. M., McGeachy, M. J., Konkel, J. E., ... O'Shea, J. J. (2010). Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling. *Nature*, *467*(7318), 967–971. <http://doi.org/10.1038/nature09447>
- Gould, J. M., & Weiser, J. N. (2001). Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infection and Immunity*, *69*(3), 1747–54. <http://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1747-1754.2001>
- Gould, J. M., & Weiser, J. N. (2002). The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *The Journal of Infectious Diseases*, *186*(3), 361–71. <http://doi.org/10.1086/341658>
- Groneck, L., Schrama, D., Fabri, M., Stephen, T.L., Harms, F., Meemboor, S., Hafke, H., Bessler, M.,

- Becker, J. C., Kalka-Moll, W. M. (2009). Oligoclonal CD4+ T cells promote host memory immune responses to Zwitterionic polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 77(9), 3705-3712.
- Hamada, S., Umemura, M., Shiono, T., Tanaka, K., Yahagi, A., Begum, M. D., ... Matsuzaki, G. (2008). IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(5), 3456–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18714018>
- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Müller, E., & Rohde, M. (2005). Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity*, 73(8), 4653–67. <http://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4653-4667.2005>
- Hyams, C., Yuste, J., Bax, K., Camberlein, E., Weiser, J. N., & Brown, J. S. (2010). Streptococcus pneumoniae Resistance to Complement-Mediated Immunity Is Dependent on the Capsular Serotype. *Infection and Immunity*, 78(2), 716–725. <http://doi.org/10.1128/IAI.01056-09>
- Hymowitz, S. G., Filvaroff, E. H., Yin, J. P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., ... Starovasnik, M. A. (2001). IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *The EMBO Journal*, 20(19), 5332–41. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.19.5332>
- IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. (1993). *Journal of Immunology*, 151(8), 4325–4332.
- Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., ... Iwakura, Y. (2009). Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host Defense against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity*, 30(1), 108–119. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.009>
- Jambo, K. C., Sepako, E., Heyderman, R. S., & Gordon, S. B. (2010). Potential role for mucosally active vaccines against pneumococcal pneumonia. *Trends in Microbiology*, 18(2), 81–9. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.001>
- Jiang, X.-L., Zhang, G.-L., Yang, T., Yang, B.-H., Wang, L.-J., Wang, Q.-H., ... Fu, Z. (2015). Association of Pneumococcal Carriage and Expression of Foxp3+ Regulatory T Cells and Th17 Cells in the Adenoids of Children. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, 90(1), 25–32. <http://doi.org/10.1159/000381724>
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., & Andrew, P. W. (2008). The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 288–301. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1871>
- Käyhty, H., Auranen, K., Nohynek, H., Dagan, R., & Mäkelä, H. (2006). Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. *Expert Review of Vaccines*, 5(5), 651–67. <http://doi.org/10.1586/14760584.5.5.651>
- Khader, S. a, Gaffen, S. L., & Kolls, J. K. (2009). Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunology*, 2(5), 403–11. <http://doi.org/10.1038/mi.2009.100>
- Kietzman, C. C., Gao, G., Mann, B., Myers, L., & Tuomanen, E. I. (2016). Dynamic capsule restructuring by the main pneumococcal autolysin LytA in response to the epithelium. *Nature Communications*, 7(1), 10859. <http://doi.org/10.1038/ncomms10859>
- Kinyanjui, M. W., Shan, J., Nakada, E. M., Qureshi, S. T., & Fixman, E. D. (2013). Dose-dependent effects of IL-17 on IL-13-induced airway inflammatory responses and airway hyperresponsiveness. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(8), 3859–68.

- <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1200506>
- Kollef, M. H., & Betthausen, K. D. (2019). New antibiotics for community-acquired pneumonia. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 1. <http://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000526>
- Koppe, U., Suttorp, N., & Opitz, B. (2012). Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cellular Microbiology*, 14(4), 460–6. [Http://Doi.Org/10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x](http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x)
- Kuipers, K., Jong, W. S. P., van der Gaast-de Jongh, C. E., Houben, D., van Opzeeland, F., Simonetti, E., ... de Jonge, M. I. (2017). Th17-Mediated Cross Protection against Pneumococcal Carriage by Vaccination with a Variable Antigen. *Infection and Immunity*, 85(10). <http://doi.org/10.1128/IAI.00281-17>
- Layoun, A., Samba, M., & Santos, M. M. (2015). Isolation of murine peritoneal macrophages to carry out gene expression analysis upon Toll-like receptors stimulation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (98), e52749. <http://doi.org/10.3791/52749>
- Lazarski, C. A., Ford, J., Katzman, S. D., Rosenberg, A. F., & Fowell, D. J. (2013). IL-4 Attenuates Th1-Associated Chemokine Expression and Th1 Trafficking to Inflamed Tissues and Limits Pathogen Clearance. *PLoS ONE*, 8(8), e71949. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0071949>
- Lee, S., Kim, G.-L., Kim, N. Y., Kim, S.-J., Ghosh, P., & Rhee, D.-K. (2018). ATF3 Stimulates IL-17A by Regulating Intracellular Ca<sup>2+</sup>/ROS-Dependent IL-1 $\beta$  Activation During *Streptococcus pneumoniae* Infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 1954. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01954>
- Lemon, J. K., Miller, M. R., & Weiser, J. N. (2015a). Sensing of interleukin-1 cytokines during *Streptococcus pneumoniae* colonization contributes to macrophage recruitment and bacterial clearance. *Infection and Immunity*, 83(8), 3204–12. <http://doi.org/10.1128/IAI.00224-15>
- Lemon, J. K., Miller, M. R., & Weiser, J. N. (2015b). Sensing of Interleukin-1 Cytokines during *Streptococcus pneumoniae* Colonization Contributes to Macrophage Recruitment and Bacterial Clearance. *Infection and Immunity*, 83(8), 3204–3212. <http://doi.org/10.1128/IAI.00224-15>
- Liang, S. C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., & Fouser, L. a. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(10), 2271–9. <http://doi.org/10.1084/jem.20061308>
- Lipsitch, M., Dykes, J. K., Johnson, S. E., Ades, E. W., King, J., Briles, D. E., & Carlone, G. M. (2000). Competition among *Streptococcus pneumoniae* for intranasal colonization in a mouse model. *Vaccine*, 18(25), 2895–901.
- Lochner, M., Peduto, L., Cherrier, M., Sawa, S., Langa, F., Varona, R., ... Eberl, G. (2008). In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ ROR $\gamma$  t+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(6), 1381–93. <http://doi.org/10.1084/jem.20080034>
- Lu, Y.-J., Forte, S., Thompson, C. M., Anderson, P. W., & Malley, R. (2009). Protection against Pneumococcal colonization and fatal pneumonia by a trivalent conjugate of a fusion protein with the cell wall polysaccharide. *Infection and Immunity*, 77(5), 2076–83. <http://doi.org/10.1128/IAI.01554-08>
- Lu, Y.-J., Gross, J., Bogaert, D., Finn, A., Bagrade, L., Zhang, Q., ... Malley, R. (2008). Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathogens*, 4(9), e1000159. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000159>

- Malley, R., Srivastava, A., Lipsitch, M., Thompson, C. M., Watkins, C., Tzianabos, A., & Anderson, P. W. (2006). Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide. *Infection and Immunity*, 74(4), 2187–95. <http://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2187-2195.2006>
- Malley, R., Trzcinski, K., Srivastava, A., Thompson, C. M., Anderson, P. W., & Lipsitch, M. (2005). CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(13), 4848–53. <http://doi.org/10.1073/pnas.0501254102>
- Man, W. H., de Steenhuijsen Pipers, W. A. A., & Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 259–270. <http://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.14>
- Marqués, J. M., Rial, A., Muñoz, N., Pelay, F.-X., Van Maele, L., Léger, H., ... Chabalgoity, J. A. (2012a). Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity. *Immunobiology*, 217(4), 420–9. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.10.012>
- Marqués, J. M., Rial, A., Muñoz, N., Pelay, F. X., Van Maele, L., Léger, H., ... Chabalgoity, J. a. (2012b). Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity. *Immunobiology*, 217, 420–429. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.10.012>
- Marriott, H. M., Hellewell, P. G., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2007). Contrasting roles for reactive oxygen species and nitric oxide in the innate response to pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*, 25(13), 2485–2490. <http://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2006.09.024>
- Martin, R. M., Brady, J. L., & Lew, A. M. (1998). The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *Journal of Immunological Methods*, 212(2), 187–192. [http://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00015-5](http://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00015-5)
- McAleer, J. P., & Kolls, J. K. (2011). Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(2), 263–70. <http://doi.org/10.1189/jlb.0211099>
- McCool, T. L., & Weiser, J. N. (2004). Limited role of antibody in clearance of *Streptococcus pneumoniae* in a murine model of colonization. *Infection and Immunity*, 72(10), 5807–13. <http://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5807-5813.2004>
- McCullers, J. A., McAuley, J. L., Browall, S., Iverson, A. R., Boyd, K. L., & Henriques Normark, B. (2010). Influenza Enhances Susceptibility to Natural Acquisition of and Disease due to *Streptococcus pneumoniae* in Ferrets. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(8), 1287–1295. <http://doi.org/10.1086/656333>
- Mina, M. J., McCullers, J. A., & Klugman, K. P. (2014). Live attenuated influenza vaccine enhances colonization of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in mice. *MBio*, 5(1). <http://doi.org/10.1128/mBio.01040-13>
- Mitsdoerffer, M., Lee, Y., Jager, A., Kim, H. J., Korn, T., Kolls, J. K., Cantor, H., Bettelli, E., Kuchroo, V.K. (2010). Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107 (32), 14292-14297.
- Moffitt, K. L., Gierahn, T. M., Lu, Y., Gouveia, P., Alderson, M., Flechtner, J. B., ... Malley, R. (2011). T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Cell Host & Microbe*, 9(2), 158–65. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2011.01.007>
- Mubarak, A., Ahmed, M. S., Upile, N., Vaughan, C., Xie, C., Sharma, R., ... Zhang, Q. (2016). A dynamic

- relationship between mucosal T helper type 17 and regulatory T-cell populations in nasopharynx evolves with age and associates with the clearance of pneumococcal carriage in humans. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(8), 736.e1-736.e7. <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.017>
- Muñoz, N., Van Maele, L., Marqués, J. M., Rial, A., Sirard, J.-C., & Chabalgoity, J. a. (2010). Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infection and Immunity*, 78(10), 4226–33. <http://doi.org/10.1128/IAI.00224-10>
- Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., ... Iwakura, Y. (2002). Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, 17(3), 375–87.
- Napolitani, G., Acosta-Rodriguez, E. V., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2009). Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *European Journal of Immunology*, 39(5), 1301–12. <http://doi.org/10.1002/eji.200838969>
- Neill, D. R., Coward, W. R., Gritzfeld, J. F., Richards, L., Garcia-Garcia, F. J., Dotor, J., ... Kadioglu, A. (2014a). Density and duration of pneumococcal carriage is maintained by transforming growth factor  $\beta$ 1 and T regulatory cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(10), 1250–9. <http://doi.org/10.1164/rccm.201401-0128OC>
- Neill, D. R., Coward, W. R., Gritzfeld, J. F., Richards, L., Garcia-Garcia, F. J., Dotor, J., ... Kadioglu, A. (2014b). Density and duration of pneumococcal carriage is maintained by transforming growth factor  $\beta$ 1 and T regulatory cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(10), 1250–1259. <http://doi.org/10.1164/rccm.201401-0128OC>
- Neill, D. R., Fernandes, V. E., Wisby, L., Haynes, A. R., Ferreira, D. M., Laher, A., ... Andrew, P. W. (2012). T regulatory cells control susceptibility to invasive pneumococcal pneumonia in mice. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002660. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002660>
- Neill, S., & Dean, N. (2019). Aspiration pneumonia and pneumonitis: a spectrum of infectious/noninfectious diseases affecting the lung. *Current Opinion in Infectious Diseases*. <http://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000524>
- Nistala, K., Adams, S., Cambrook, H., Ursu, S., Olivito, B., de Jager, W., ... Wedderburn, L. R. (2010). Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14751–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1003852107>
- Nurieva, R., Yang, X. O., Chung, Y., & Dong, C. (2009). Cutting edge: in vitro generated Th17 cells maintain their cytokine expression program in normal but not lymphopenic hosts. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(5), 2565–8. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0803931>
- Olliver, M., Hiew, J., Mellroth, P., Henriques-Normark, B., & Bergman, P. (2011). Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 79(10), 4210–7. <http://doi.org/10.1128/IAI.05286-11>
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., ... Blumberg, R. S. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6080), 489–93. <http://doi.org/10.1126/science.1219328>
- Paukner, S., Gelone, S. P., Arends, S. J. R., Flamm, R. K., & Sader, H. S. (2019). Antibacterial Activity of Lefamulin Against Pathogens Most Commonly Causing Community-Acquired Bacterial Pneumonia: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2015–2016). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <http://doi.org/10.1128/AAC.02161-18>
- Peñaloza, H. F., Nieto, P. A., Muñoz-Durango, N., Salazar-Echegarai, F. J., Torres, J., Parga, M. J., ...

- Bueno, S. M. (2015). Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Immunology*, *146*(1), 100–112. <http://doi.org/10.1111/imm.12486>
- Pericone, C. D., Overweg, K., Hermans, P. W., & Weiser, J. N. (2000). Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infection and Immunity*, *68*(7), 3990–7.
- Petrushina, I., Tran, M., Sadzikava, N., Ghochikyan, A., Vasilevko, V., Agadjanyan, M. G., & Cribbs, D. H. (n.d.). *Importance of IgG2c isotype in the immune response to b-amyloid in amyloid precursor protein/transgenic mice*. Retrieved from [www.elsevier.com/locate/neulet](http://www.elsevier.com/locate/neulet)
- Petrushina, I., Tran, M., Sadzikava, N., Ghochikyan, A., Vasilevko, V., Agadjanyan, M. G., & Cribbs, D. H. (2003). Importance of IgG2c isotype in the immune response to beta-amyloid in amyloid precursor protein/transgenic mice. *Neuroscience Letters*, *338*(1), 5–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12565127>
- Pido-Lopez, J., Kwok, W. W., Mitchell, T. J., Heyderman, R. S., & Williams, N. a. (2011). Acquisition of pneumococci specific effector and regulatory Cd4+ T cells localising within human upper respiratory-tract mucosal lymphoid tissue. *PLoS Pathogens*, *7*(12), e1002396. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002396>
- PNEUMONIA THE FORGOTTEN KILLER OF CHILDREN. (n.d.). Retrieved from [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43640/9280640489\\_eng.pdf;jsessionid=F33497ADF5039C1511292DC88777A79E?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43640/9280640489_eng.pdf;jsessionid=F33497ADF5039C1511292DC88777A79E?sequence=1)
- Quián, J. (2010). Actualizaciones del Certificado Esquema de Vacunación . Perspectivas a futuro en vacunación en la niñez, *81*(1), 34–45.
- Renz, H., Brandtzaeg, P., & Hornef, M. (2012). The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *12*(1), 9–23. <http://doi.org/10.1038/nri3112>
- Rial, A., Ferrara, F., Suárez, N., Scavone, P., Marqués, J. M., & Chabalgoity, J. A. (2016). Intranasal administration of a polyvalent bacterial lysate induces self-restricted inflammation in the lungs and a Th1/Th17 memory signature. *Microbes and Infection*, *18*(12), 747–757. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.10.006>
- Rial, M. A. (n.d.). Estudio de los mecanismos inmunes involucrados en la protección frente a la infección por *Streptococcus pneumoniae*. Tesis de Doctorado en Química. 2011.
- Rios, F. J., Touyz, R. M., & Montezano, A. C. (2017). Isolation and Differentiation of Murine Macrophages. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1527, pp. 297–309). [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-6625-7\\_23](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-6625-7_23)
- Ritchie, N. D., Ijaz, U. Z., & Evans, T. J. (2017). IL-17 signalling restructures the nasal microbiome and drives dynamic changes following *Streptococcus pneumoniae* colonization. *BMC Genomics*, *18*(1), 807. <http://doi.org/10.1186/s12864-017-4215-3>
- Roche, A. M., King, S. J., & Weiser, J. N. (2007). Live attenuated *Streptococcus pneumoniae* strains induce serotype-independent mucosal and systemic protection in mice. *Infection and Immunity*, *75*(5), 2469–75. <http://doi.org/10.1128/IAI.01972-06>
- Rubins, J. B., & Charboneau, D. (2000). Effect of anesthetics on pathogenesis of experimentally induced murine pneumococcal pneumonia. *Comparative Medicine*, *50*(3), 292–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10894495>
- Rutz, S., Eidschenk, C., & Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunological*

- Reviews*, 252(1), 116–132. <http://doi.org/10.1111/imr.12027>
- Schuijt, T. J., Lankelma, J. M., Scicluna, B. P., de Sousa e Melo, F., Roelofs, J. J. T. H., de Boer, J. D., ... Wiersinga, W. J. (2016a). The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut*, 65(4), 575–83. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309728>
- Schuijt, T. J., Lankelma, J. M., Scicluna, B. P., de Sousa e Melo, F., Roelofs, J. J. T. H., de Boer, J. D., ... Wiersinga, W. J. (2016b). The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut*, 65(4), 575–583. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309728>
- Siegel, S. J., Tamashiro, E., & Weiser, J. N. (2015a). Clearance of Pneumococcal Colonization in Infants Is Delayed through Altered Macrophage Trafficking. *PLoS Pathogens*, 11(6), e1005004. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005004>
- Siegel, S. J., Tamashiro, E., & Weiser, J. N. (2015b). Clearance of Pneumococcal Colonization in Infants Is Delayed through Altered Macrophage Trafficking. *PLOS Pathogens*, 11(6), e1005004. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005004>
- Song, J. Y., Nahm, M. H., & Moseley, M. A. (2013). Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. *Journal of Korean Medical Science*, 28(1), 4–15. <http://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.1.4>
- Stojanović, I., Cvjetičanin, T., Lazaroski, S., Stošić-Grujičić, S., & Miljković, D. (2009). Macrophage migration inhibitory factor stimulates interleukin-17 expression and production in lymph node cells. *Immunology*, 126(1), 74–83. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02879.x>
- Trzcin, K., Thompson, C., Malley, R., & Lipsitch, M. (n.d.). Antibodies to Conserved Pneumococcal Antigens Correlate with , but Are Not Required for , Protection against Pneumococcal Colonization Induced by Prior Exposure in a Mouse Model, 7043–7046. <http://doi.org/10.1128/IAI.73.10.7043>
- US CDC report on antibiotic resistance threats in the United States, 2013. (n.d.). Retrieved January 27, 2019, from <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/us-cdc-report-antibiotic-resistance-threats-united-states-2013>
- van der Poll, T., & Opal, S. M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 374(9700), 1543–56. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61114-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61114-4)
- van Rossum, A. M. C., Lysenko, E. S., & Weiser, J. N. (2005). Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infection and Immunity*, 73(11), 7718–26. <http://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7718-7726.2005>
- Vignali, D. A. A., & Kuchroo, V. K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*, 13(8), 722–728. <http://doi.org/10.1038/ni.2366>
- Vu, H. T. T., Yoshida, L. M., Suzuki, M., Nguyen, H. A. T., Nguyen, C. D. L., Nguyen, A. T. T., ... Vu, T. D. (2011). Association between nasopharyngeal load of *Streptococcus pneumoniae*, viral coinfection, and radiologically confirmed pneumonia in Vietnamese children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30(1), 11–8. <http://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181f111a2>
- Wang, D.-Y., Li, Y., Yan, Y., Li, C., & Shi, L. (2015). Upper airway stem cells: understanding the nose and role for future cell therapy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(1), 490. <http://doi.org/10.1007/s11882-014-0490-0>
- Wang, W., Zhou, A., Zhang, X., Xiang, Y., Huang, Y., Wang, L., ... He, Y. (2014). Interleukin 17A promotes pneumococcal clearance by recruiting neutrophils and inducing apoptosis through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism in acute otitis media. *Infection and Immunity*. <http://doi.org/10.1128/IAI.00006-14>

- Wani, J. H., Gilbert, J. V, Plaut, A. G., & Weiser, J. N. (1996). Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 64(10), 3967–74. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=174324&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Washington, D. C., Sanitaria, V., & Internacionales, R. S. (2011). Informe Regional de SIREVA II , 2011 : Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de.
- Weiser, J. N., Ferreira, D. M., & Paton, J. C. (2018). *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews Microbiology*, 16(6), 355–367. <http://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8>
- Wernette, C. M., Frasch, C. E., Madore, D., Carlone, G., Goldblatt, D., Plikaytis, B., ... Nahm, M. H. (2003). Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(4), 514–9.
- WHO | The top 10 causes of death. (2017). WHO. Retrieved from <http://origin.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Who, W. H. O. (2007). World Health Report. *World, 2008*, 96. Retrieved from <http://media.ft.com/cms/aa1641a8-9cdb-11e0-bf57-00144feabdc0.pdf>
- Xu, S., & Cao, X. (2010). Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cellular and Molecular Immunology*, 7(3), 164–174. <http://doi.org/10.1038/cmi.2010.21>
- Yuksel, H., & Turkeli, A. (2017). Airway epithelial barrier dysfunction in the pathogenesis and prognosis of respiratory tract diseases in childhood and adulthood. *Tissue Barriers*, 5(4), e1367458. <http://doi.org/10.1080/21688370.2017.1367458>
- Zafar, M. A., Wang, Y., Hamaguchi, S., & Weiser, J. N. (2017). Host-to-Host Transmission of *Streptococcus pneumoniae* Is Driven by Its Inflammatory Toxin, Pneumolysin. *Cell Host & Microbe*, 21(1), 73–83. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.005>
- Zhang, Y.-H., He, M., Wang, Y., & Liao, A.-H. (2017). Modulators of the Balance between M1 and M2 Macrophages during Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, 8, 120. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00120>
- Zhang, Z., Clarke, T. B., & Weiser, J. N. (n.d.). Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice, (18). <http://doi.org/10.1172/JCI36731>. Moreover
- Zhang, Z., Clarke, T. B., & Weiser, J. N. (2009). Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *Journal of Clinical Investigation*. <http://doi.org/10.1172/JCI36731>
- Zhu, L., Zhao, Q., Yang, T., Ding, W., & Zhao, Y. (2015). Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *International Reviews of Immunology*, 34(1), 82–100. <http://doi.org/10.3109/08830185.2014.969421>