

Facultad de Ciencias – PEDECIBA Biología - Universidad de la República

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

# CONTRIBUCIÓN A LA CARACTERIZACIÓN DE TMEM176B COMO UN INMUNORREGULADOR EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

Lic. Daniela Olivera De Luca

Laboratorio de Inmunorregulación e Inflamación

Tutor: Dr. Marcelo Hill  
Co-tutora: Dra. Mercedes Segovia

Tribunal: Dra. María Moreno, Dra. Cristina Vázquez y Dr. Sergio Bianchi

# Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis doctoral.

A mis tutores, Marcelo Hill y Mercedes Segovia

, por su guía, confianza y estímulo diario. Gracias por transmitirme su pasión por la ciencia, y en especial por la Inmunología.

A María Moreno, Cristina Vázquez y Sergio Bianchi por aceptar formar parte del tribunal de esta tesis. A los integrantes de la “Comisión de Avance y Seguimiento”: Teresa Freire, Emiliano Trías y, nuevamente, María, por acompañar este proceso.

A mis compañeros y compañeras del LIRI (y ex – LIRI): Sofía, Marianela, Álvaro, Julia, Tiziana, Laura, Vanessa, Lucía, David, Germán, Mauricio, Mateo, Marcela, Valentina, Alejandro, Javier, Maite y Antonella, por su colaboración cotidiana. En especial, a Maite y Antonella por su participación y trabajo en experimentos que contribuyeron a esta tesis doctoral, y a Sofía y Marianela por su constante disposición y asistencia en el trabajo diario.

A las y los integrantes de la Unidad Académica de Inmunobiología de la Facultad de Medicina (UdelaR), por las horas compartidas en la docencia y la vida diaria del departamento. En especial a Otto Pritsch y Florencia Rammauro que participaron en este trabajo.

A Mauricio Bertullo y Verónica Noya quienes amablemente nos permitieron obtener las muestras de los pacientes, y también a estos pacientes.

A las y los investigadores con quienes tuve el privilegio de colaborar. En especial a Gabriel Rabinovich, Cristina Cuturi e Ignacio Anegón por abrirme las puertas de sus laboratorios y por el cálido recibimiento, así como a los integrantes de sus equipos por su colaboración y asistencia durante el desarrollo de mis pasantías.

A Natalia Lago, por su formación en el modelo de EAE, y a Bruno Pannunzio, por su guía en el área de la Neurociencia.

A todos los compañeros de nuestros laboratorios vecinos LLC, GMH y PME.

A la Unidad de Biología Celular por la asistencia técnica durante mi doctorado.

A los integrantes de la Unidad de Biotecnología de Animales de Laboratorio, particularmente a Martina Crispo, Gabriel Fernández y Ana Paula Arévalo por su asistencia técnica en los distintos modelos animales. A Andrea Massa y Sergio Ancheta por el apoyo cotidiano.

A la ANII, CAP, PEDECIBA, Instituto Pasteur y FOCIS por el apoyo académico y financiero.

Finalmente a mi familia, mis padres, mi hermana Inés, a Luca y los amigos y amigas de siempre. Esta tesis es también fruto de su cariño, escucha y sostén incondicional. Gracias por acompañarme en este proceso de crecimiento que trasciende lo académico, no habría sido posible sin cada uno de ustedes.

# Índice de Contenidos

Abreviaturas .....	6
Resumen .....	10
Introducción .....	11
1. De la homeostasis a la patología: el rol central de la inflamación .....	11
1.1 La inflamación en condiciones fisiológicas .....	11
1.2 La resolución de la inflamación y su impacto en la patología .....	12
2. El inflamasoma NLRP3 como mediador de la inflamación.....	15
2.1 Los inflamasomas como sensores de la inflamación.....	15
2.2 El inflamasoma NLRP3 en el escenario fisiopatológico .....	20
3. La Inflamación como regulador de respuestas mediadas por linfocitos T.....	22
4. La inflamación severa en la interfase hospedero-patógeno: infección por $\beta$ -Coronavirus .....	27
4.1 La respuesta inflamatoria en la infección por $\beta$ -Coronavirus.....	27
4.2 Mecanismos asociados a la severidad .....	29
5. La inflamación descontrolada en el contexto de la autoinmunidad: El caso de la Esclerosis Múltiple (EM) .....	33
5.1 Definición y etiología de la EM.....	33
5.2 Inmunopatología de la EM .....	35
6. Galectina-1: Un modulador clave de la inflamación aguda y crónica .....	39
7. Tmem176b: un inmunorregulador emergente .....	42
Hipótesis .....	47
Objetivos .....	48
Objetivo general.....	48
Objetivo específico 1 .....	48
Objetivo específico 2 .....	48
Materiales y métodos .....	49
1.Pacientes y donantes sanos .....	49
2. Animales.....	50
3. Virus .....	50
4. Células .....	51
5. Modelo murino de infección con MHV-A59 .....	51
6. Ensayo de citotoxicidad celular <i>in vivo</i> de linfocitos T.....	52
7. Infección con SARS-CoV-2 y generación de medio condicionado .....	52

8. Obtención de linfocitos humanos y reacción linfocitaria mixta .....	53
9. Estimulación <i>in vitro</i> de PBMCs con péptidos de SARS-CoV-2 .....	53
10. Análisis de carga viral y expresión génica por RT-qPCR.....	54
10. 1 Evaluación de la carga viral de MHV-A59 .....	54
10. 2 Evaluación de la carga viral de SARS-CoV-2.....	54
10. 3 Análisis de Tmem176b en tejidos de ratón o cultivos celulares.....	54
11. Cuantificación de la activación del inflamasoma .....	55
12. Análisis por Western blot .....	55
13. Activación del inflamasoma <i>in vitro</i> .....	56
14. Transfección de células THP-1 y activación del inflamasoma .....	57
15. Activación del inflamasoma <i>in vivo</i> .....	58
16. Ensayo de encefalomielitis autoinmune experimental.....	58
17. Tinción por Inmunofluorescencia .....	59
17. 1 Hígado .....	59
17.2 Médula espinal.....	60
17. 3 Inmunofluorescencia en células CHO .....	62
18. Determinación del $\text{Ca}^{2+}$ citosólico en células dendríticas .....	62
19. Tinción con Luxol Fast Blue .....	62
20. Análisis hematológicos .....	63
21. Ensayo de co-precipitación Tmem176b/Galectina-1 .....	63
22. Ensayo de actividad iónica de TMEM176B.....	64
23. Procesamiento de órganos murinos y adquisición por citometría de flujo .....	65
24. Análisis Estadístico.....	66
25. Reactivos .....	67
Resultados .....	71
1. TMEM176B actúa como un canal catiónico inmunorregulador en la infección severa por $\beta$ -coronavirus.....	71
1.1 - TMEM176B tiene un rol protector en la infección por $\beta$ -coronavirus a través de la inhibición del inflamasoma .....	71
1.2 - La activación del inflamasoma en ratones Tmem176b $^{-/-}$ induce un estado de agotamiento en linfocitos T CD8 $^{+}$ .....	81
1.3 – El eje inflamasoma/disfunción T se asoció con la severidad en la COVID-19 ...	85
1.4 - La modulación farmacológica de TMEM176B <i>in vitro</i> modula el eje inflamasoma/disfunción T inducido por el SARS-CoV-2 .....	91
2. TMEM176B protege frente a la encefalomielitis autoinmune y constituye un potencial blanco terapéutico .....	96

2.1 Tmem176b protege de la severidad en la Encefalomielitis Autoinmune Experimental .....	96
2.2 La delección de Tmem176b se asoció con el agotamiento de los linfocitos T CD8 <sup>+</sup> y la modulación de células Th17 .....	107
2.3 Galectina-1 inhibe al inflamasoma en forma dependiente de TMEM176B y emerge como posible estrategia terapéutica para modular a este canal iónico .....	117
2.4 El SNP rs2072443 (sustitución A134T) de TMEM176B es una variante con pérdida de función que puede ser rescatada por Galectina-1 .....	130
Discusión .....	133
Conclusiones y perspectivas .....	151
Referencias .....	153
Anexo 1 .....	174
Anexo 2. Producción científica asociada a la tesis .....	175
1. Publicaciones directamente asociadas a la tesis .....	175
2. Otras publicaciones durante el período doctoral .....	175
3. Presentaciones en congresos .....	176
4. Contribuciones tecnológicas e invenciones .....	177
5. Formación de estudiantes .....	178
6. Reconocimientos .....	178

## Abreviaturas

**ACE2** – Receptor de la enzima convertidora de Angiotensina 2 (Del Inglés: *Angiotensin Converting Enzyme 2*)

**AIM2** - Receptor de tipo ausente en melanoma 2 (Del inglés: *Absent in melanoma 2*)

**APCs** – Célula presentadora de antígeno (Del inglés: *Antigen-Presenting Cells*)

**ARDS** - Síndrome de dificultad respiratoria aguda (Del inglés: *Acute Respiratory Disease Syndrome*)

**ASC** – Proteína adaptadora ASC (Del inglés: *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*)

**BHE** – Barrera Hemato-Encefálica

**BMDCs** – Células dendríticas derivadas de la médula ósea (Del inglés: *Bone Marrow Derived Dendritic Cells*)

**BMDMs** – Macrófagos derivados de la médula ósea (Del inglés: *Bone Marrow Derived Macrophages*)

**CAPS** – Síndromes periódicos asociados a la criopirina (Del inglés: *Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes*)

**CLICs** – Canales iónicos CLIC (Del inglés: *Chloride Intracellular Channels*)

**CMV** – Citomegalovirus (Del inglés: *Cytomegalovirus*)

**COVID-19** – Enfermedad por coronavirus 2019

**CRD** – Dominio de reconocimiento de carbohidratos (Del inglés: *Carbohydrate Recognition Domain*)

**CTLA-4** – Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (Del inglés: *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*)

**DAMPS** - Patrones moleculares asociados al daño (Del inglés: *Damage Associated Molecular Patterns*)

**DCs** – Células dendríticas (Del inglés: *Dendritic Cells*)

**EAE** – Encefalomielitis autoinmune experimental (Del inglés: *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

**EBV** – Epstein Barr Virus

**EDSS** – Escala expandida del estado de discapacidad (Del inglés: *Expanded Disability Status Scale*)

**EGFR** – Receptor del factor de crecimiento epidérmico (Del inglés: *Epidermal Growth Factor Receptor*)

**EM** - Esclerosis Múltiple

**ENaC** – Canal epitelial de sodio (Del inglés: *Epithelial Sodium Channel*)

**FCAS** – Síndrome autoinflamatorio familiar por frío (Del inglés: *Familial Cold Autoinflammatory Syndrome*)

**Gal-1** – Galectina-1

**GATA-3** – Factor de transcripción GATA-3 (Del inglés: *GATA-binding protein 3*)

**GM-CSF** – Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Del inglés: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

**GSDMD** – Gasdermina D

**HCV** – Virus de la Hepatitis C (Del inglés: *Hepatitis C Virus*)

**ICAM-1** – Molécula de adhesión intercelular 1 (Del inglés: *Intercellular Adhesion Molecule 1*)

**IFN- $\alpha/\beta/\gamma$**  - Interferón alfa/beta/gamma

**IRF-3** – Factor regulador de interferón 3 (Del inglés: *Interferon Regulatory Factor 3*)

**JNK** – Quinasa de c-Jun N-terminal (Del inglés: *c-Jun N-terminal Kinase*)

**KCa** – Canales de K<sup>+</sup> operados por Ca<sup>2+</sup> (Del inglés: *Calcium-activated K<sup>+</sup> channels*)

**LCR** – Líquido Cefalorraquídeo

**LFA-1** – Antígeno 1 de función linfocitaria (Del inglés: *Lymphocyte Function-associated Antigen 1*)

**LXA4** – Lipoxina A4

**MDA5** – Proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5 (Del inglés: *Melanoma Differentiation-Associated Protein 5*)

**MERS** - Coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio (Del inglés: *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*)

**MHC** – Complejo mayor de histocompatibilidad (Del inglés: *Major Histocompatibility Complex*)

**MHV** – Virus de Hepatitis Murina (Del inglés: *Murine Hepatitis Virus*)

**MS4A** – Subfamilia A de 4 dominios transmembrana (Del inglés: *Membrane-Spanning 4-domains Subfamily A*)

**mtDNA** – ADN mitocondrial (Del inglés: *mitochondrial DNA*)

**mTOR** – Objetivo de la rapamicina en mamíferos (Del inglés: *mammalian Target of Rapamycin*)

**MWS** – Síndrome de Muckle-Wells (Del inglés: *Muckle-Wells Syndrome*)

**NEK7** – Quinasa relacionada con Never in Mitosis A 7 (Del inglés: *NIMA-related kinase 7*)

**NF-κB** – Factor nuclear kappa B (Del inglés: *Nuclear Factor kappa B*)

**NLRP3** - Receptor tipo NOD con dominio de pirina 3 (Del inglés: *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*)

**NOMID** – Enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal (Del inglés: *Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease*)

**P2X7** – Receptor purinérgico P2X7 (Del inglés: *P2X7 purinergic receptor*)

**PAMPS** – Patrones moleculares asociados a patógenos (Del inglés: *Pathogen Associated Molecular Patterns*)

**PD-1** – Proteína de muerte celular programada 1 (Del inglés: *Programmed Cell Death Protein 1*)

**PDGF** - Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (Del inglés: *Platelet-Derived Growth Factor*)

**PD-L1** – Ligando 1 de muerte celular programada (Del inglés: *Programmed Cell Death Ligand 1*)

**PPMS** – Esclerosis múltiple primaria progresiva (Del inglés: *Primary Progressive Multiple Sclerosis*)

**PRRs** – Receptores de reconocimiento de patrón (Del inglés: *Pattern Recognition Receptors*)

**RIG-I** – Receptor inducible por ácido retinoico I (Del inglés: *Retinoic Acid-Inducible Gene I*)

**RNS** – Especies reactivas de nitrógeno (Del inglés: *Reactive Nitrogen Species*)

**ROR $\gamma$ T** – Factor de transcripción ROR $\gamma$ T (Del inglés: *RAR-related orphan receptor gamma T*)

**ROS** – Especies reactivas de oxígeno (Del inglés: *Reactive Oxygen Species*)

**RRMS** – Esclerosis múltiple remitente-recurrente (Del inglés: *Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis*)

**RSV** – Virus Sincicial Respiratorio (Del inglés: *Respiratory Syncytial Virus*)

**SARS-CoV-2** Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo tipo 2 (Del inglés: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*)

**SMAD** – Proteínas que transducen señales de TGF-β, acrónimo de los genes *sma* y *mad*. (Del inglés: *Small y Mothers Against Decapentaplegic*)

**SNC** – Sistema Nervioso Central

**SPMS** – Esclerosis múltiple secundaria progresiva (Del inglés: *Secondary Progressive Multiple Sclerosis*)

**T-bet** – Factor de transcripción T-bet (Del inglés: *T-box expressed in T cells*)

**TGF-β** – Factor de Crecimiento Transformante Beta (Del inglés: *Transforming Growth Factor β*)

**Th17<sub>eff</sub>** – Células Th17 efectoras

**Th17<sub>reg</sub>** – Células Th17 reguladoras

**TIGIT** – Inmunorreceptor de células T con dominios de inmunoglobulina e ITIM (Del inglés: *T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains*)

**TLRs** – Receptores tipo Toll (Del inglés: *Toll-like Receptors*)

**TNF-α** – Factor de necrosis tumoral alfa (Del inglés: *Tumor Necrosis Factor-alpha*)

**TORID** – Relacionado a la tolerancia e inducido (Del inglés: *Tolerance Related and Induced*)

**T<sub>pex</sub>** – Células T exhaustas progenitoras

**TWIK2** – Canal de potasio tipo dos poros TWIK2 (Del inglés: *Tandem of P domains in a Weak Inwardly rectifying K<sup>+</sup>channel 2*)

**VCAM-1** – Molécula de adhesión de células vasculares 1 (Del inglés: *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*)

**VEGF-α** – Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular alfa (Del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor A*)

**VLA-4** – Antígeno 4 muy tardío (Del inglés: *Very Late Antigen 4*)

**VRACs** – Canales de volumen regulado para aniones (Del inglés: *Volume-Regulated Anion Channels*)

## Resumen

La respuesta inflamatoria es un componente esencial para la defensa del organismo, pero su activación desmedida o fallas en su resolución pueden resultar en daño tisular y enfermedad. Así, comprender los mecanismos que regulan la inflamación resulta clave para abordar distintos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Nuestro grupo de trabajo se ha centrado en caracterizar la función inmunorreguladora del canal catiónico TMEM176B, previamente descrito como un inhibidor del inflamasoma NLRP3 capaz de inhibir respuestas inmunes antitumorales y favorecer la tolerancia al alotrasplante. Estas observaciones nos llevaron a proponer que TMEM176B podría actuar como un factor protector en contextos de inflamación patogénica donde resultase beneficioso inhibir la activación del inflamasoma. En esta tesis demostramos que TMEM176B ejerce una función protectora frente a procesos inflamatorios exacerbados, como la infección por  $\beta$ -coronavirus y la encefalomieltitis autoinmune. Observamos que TMEM176B previene la disfunción de linfocitos T CD8 $^{+}$  durante la infección viral al restringir la activación del inflamasoma. En el modelo de Encefalomieltitis Autoinmune Experimental, su presencia atenuó la severidad de la enfermedad mediante mecanismos dependientes de la inhibición del inflamasoma y la modulación de células T CD8 $^{+}$  exhaustas y Th17 patogénicas. Además, demostramos que la actividad de TMEM176B puede ser modulada farmacológicamente por moléculas como la Isoquerctina y Galectina-1, identificando un nuevo eje inmunorregulador TMEM176B/GAL-1 con potencial valor terapéutico. Finalmente, identificamos en humanos al polimorfismo rs2072443 de TMEM176B como una variante con pérdida de función cuya actividad iónica fue restaurada por GAL-1. En adelante, será relevante explorar el rol de TMEM176B en la esclerosis múltiple (EM), donde GAL-1 podría ofrecer una vía terapéutica prometedora. En suma, este trabajo sienta las bases para profundizar en los mecanismos inmunológicos por los que TMEM176B ejerce su rol protector en la EM y ampliar su estudio a otros contextos autoinmunes o autoinflamatorios.

# Introducción

## 1. De la homeostasis a la patología: el rol central de la inflamación

### 1.1 La inflamación en condiciones fisiológicas

La inflamación puede entenderse como una respuesta biológica compleja, inespecífica y autolimitada que integra componentes celulares y moleculares del sistema inmune, vascular y nervioso frente a una agresión. Para ello, sigue una serie de pasos secuenciales que buscan eliminar al agente perjudicial y promover la reparación del tejido. Este proceso se encuentra altamente regulado por los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa, que coordinan las respuestas de los distintos actores involucrados en la inflamación. Sus causas pueden ser diversas: desde la invasión por patógenos y la presencia de traumatismos, hasta reacciones inmunitarias del hospedero frente a componentes propios como sucede en las enfermedades autoinmunes <sup>1,2</sup>.

En condiciones normales o canónicas la respuesta inflamatoria se desarrolla de forma aguda. Este proceso comienza con la detección del agente dañino en los tejidos extravasculares por actores de la inmunidad innata, como células epiteliales, mastocitos, macrófagos y células dendríticas, que al reconocer estímulos asociados a patógenos o al daño (PAMPs o DAMPS, respectivamente) se activan y secretan mediadores pro-inflamatorios como quimioquinas, citoquinas, radicales libres, aminas vasoactivas y eicosanoides como prostaglandinas y leucotrienos <sup>1,2</sup>. Estos eventos inducen cambios a nivel microvascular, como el aumento de moléculas de adhesión en las células endoteliales <sup>1,2</sup>, que promueven la movilización temprana de leucocitos como neutrófilos, seguida de monocitos, junto con el traslado de proteínas plasmáticas desde la circulación hacia el tejido <sup>1,2</sup>. Los leucocitos reclutados, junto con las células residentes del tejido secretan citoquinas pro-inflamatorias e intentan eliminar al agente agresor. A su vez, las células dendríticas promueven la activación de linfocitos T y B de la inmunidad adaptativa, que refuerzan la respuesta con mecanismos más específicos para el estímulo inicial <sup>1,2</sup>.

Cuando el agente causal es eliminado, la inflamación se resuelve y el daño tisular, generalmente reversible, es reparado. Esta respuesta inflamatoria aguda es esencial para la defensa del organismo, y sin ella, las infecciones no se controlarían, las heridas no serían capaces de cicatrizar y los tejidos quedarían permanentemente dañados. Sin embargo, una exacerbación desmedida de esta respuesta puede desencadenar en fenómenos patológicos como la sepsis <sup>3</sup>. De igual forma, si la inflamación no se resuelve apropiadamente puede transitar hacia un estado crónico, en el cual la persistencia del proceso inflamatorio favorece la aparición de distintas patologías como enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, vasculares, el cáncer y la obesidad <sup>4</sup>. Por lo tanto, la correcta regulación de la respuesta inflamatoria es esencial para asegurar una resolución adecuada y prevenir efectos perjudiciales que resulten en la patología. En esta tesis, se profundizará en los mecanismos que controlan y promueven la resolución de la inflamación.

## *1.2 La resolución de la inflamación y su impacto en la patología*

Como fue mencionado anteriormente, la respuesta inflamatoria aguda tiene una gran capacidad para movilizar leucocitos e inducir la secreción de mediadores solubles que colaboren en la erradicación del agente dañino. Esta puede desarrollarse en minutos u horas y permanecer por días <sup>2,5,6</sup>. Se caracteriza por inducir cambios profundos en el sistema vascular y manifestaciones menores, como el enrojecimiento, el pus o la formación de abscesos <sup>2,5,6</sup>. Sin embargo, una vez que el agente agresor ha sido eliminado, es necesario que la inflamación cese, se resuelva y se repare el tejido dañado <sup>2,5,6</sup>. Inicialmente, se concebía a la resolución como un proceso pasivo, dado por la dilución de los gradientes de quimioquinas y citoquinas. Hoy sabemos que es un proceso activo y altamente controlado. A grandes rasgos este implica: i) el cese del infiltrado de neutrófilos ii) un cambio en el perfil de citoquinas y moléculas secretadas y iii) la remoción de los leucocitos acumulados en el tejido <sup>2</sup>.

Los leucocitos acumulados, principalmente neutrófilos, pueden ser removidos por migración reversa, drenaje linfático o apoptosis. Las células apoptóticas son posteriormente fagocitadas por macrófagos en un proceso conocido como “eferocitosis” que desempeña un rol dual <sup>7</sup>. Por un lado, promueve la limpieza del tejido afectado, limitando la inflamación; por otro, induce una reprogramación en su fenotipo celular, desde un estado fagocítico pro-inflamatorio a uno resolutivo <sup>7</sup>. Esta reprogramación se asocia con la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el TGF-β, así como con factores de crecimiento como VEGF-α, PDGF y TGF-β1. Estas moléculas actúan en conjunto y pueden promover la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, la síntesis de colágeno, la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis, lo que conduce a una recuperación completa, estructural y funcional, del tejido <sup>7,8</sup>.

En paralelo, se produce un cambio en el perfil de los mediadores lipídicos: se detiene la producción de eicosanoides pro-inflamatorios como prostaglandinas y leucotrienos, y comienzan a sintetizarse lipoxinas, como la LXA4, de carácter pro-resolutivo <sup>2,9</sup>. Adicionalmente, la propia respuesta inflamatoria induce la síntesis de otros mediadores lipídicos, como resolvinas, protectinas y maresinas, que colabora en su resolución al inhibir la infiltración de leucocitos, estimulan la fagocitosis de restos apoptóticos y favorecen la regeneración tisular <sup>10</sup>.

La respuesta inflamatoria induce además la producción de otros mediadores pro-resolutivos como la Anexina-A1 y la Galectina-1. La anexina A1 regula la extravasación de leucocitos y facilita el proceso de eferocitosis <sup>11-13</sup>, mientras que la Galectina-1 actúa sobre células de la inmunidad innata y adaptativa, induciendo la apoptosis de células T activadas y favoreciendo la polarización de macrófagos hacia un fenotipo resolutivo <sup>14</sup>. Finalmente, existen moléculas de naturaleza diversa como mediadores gaseosos (H<sub>2</sub>S y CO), purinas (Adenosina) y neuromoduladores (acetilcolina y otros neuropéptidos) liberados bajo la acción del nervio vago, que colaboran como agentes pro-resolutivos <sup>15-17</sup>.

En su conjunto, la resolución de la inflamación implica procesos activos y controlados a nivel celular que conllevan cambios fenotípicos y son acompañados por un cambio en el perfil de secreción de moléculas solubles. Sin embargo,

cuando este mecanismo falla o es inadecuado, las consecuencias pueden ser significativas, desencadenando procesos patológicos.

La inflamación aguda puede resultar perjudicial en situaciones donde la respuesta ocurre de forma desproporcionada. Un ejemplo de ello es la respuesta frente a ciertas infecciones, donde el estímulo inflamatorio induce una liberación masiva de citoquinas pro-inflamatorias, conocido como tormenta de citoquinas o síndrome de liberación citoquínica <sup>3</sup>. Este fenómeno puede provocar una respuesta sistémica extrema como la sepsis o el shock séptico donde ocurre un colapso circulatorio y una coagulación intravascular diseminada <sup>3</sup>.

Además, si la agresión persiste o el daño tisular es prolongado, la respuesta se convierte en crónica. <sup>18</sup>. La inflamación crónica implica principalmente la activación de leucocitos como monocitos, macrófagos y linfocitos que rápidamente reemplazan a los neutrófilos de vida corta. Si bien la inmunidad innata participa de este proceso, es la respuesta adaptativa, mediada por citoquinas de células T, la que lo induce fuertemente. Los signos distintivos de la inflamación crónica incluyen entonces, la infiltración de macrófagos, linfocitos T y células plasmáticas en el tejido afectado, que producen citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y enzimas, que contribuyen a la progresión del daño tisular y procesos de reparación secundaria, incluyendo fibrosis y formación de granulomas, entre otros <sup>19-22</sup>. Este proceso de inflamación crónica se observa en distintas enfermedades autoinmunes como el lupus, la artritis reumatoidea y la esclerosis múltiple.

Resulta claro entonces que cuando la inflamación no ocurre en condiciones normales puede derivar en patología. En este contexto, comprender mejor los mecanismos celulares y moleculares que dirigen y regulan la inflamación podría abrir nuevas posibilidades para desarrollar terapias más eficaces en enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Dentro de estos procesos moleculares, pasaremos a poner foco en el inflamasoma NLRP3. Este complejo macromolecular cobra importancia en distintas patologías de carácter inflamatorio, tanto en procesos de carácter agudo como crónico <sup>23-28</sup> y es especialmente relevante en la temática de esta tesis.

## 2. El inflamasoma NLRP3 como mediador de la inflamación

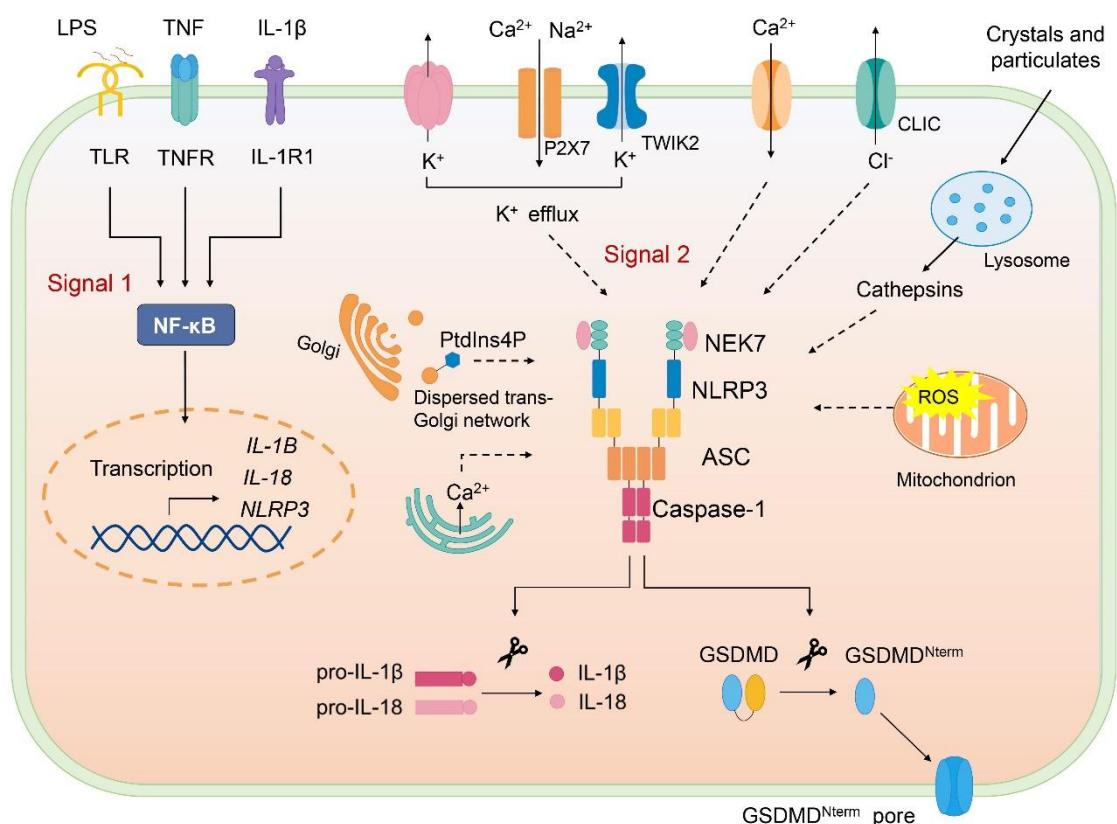
### 2.1 Los inflamasomas como sensores de la inflamación

El proceso inflamatorio descrito hasta el momento es orquestado y regulado por distintos componentes moleculares. Uno de estos componentes claves son los inflamasomas, complejos multi-proteicos intracelulares, pertenecientes a la inmunidad innata, que se ensamblan en el citosol al detectar señales asociadas al estrés celular. Estos están formados por tres componentes principales: una proteína sensora, que suele pertenecer a la familia AIM2 (Ausente en melanoma 2) o NLR (dominio de unión a nucleótidos [NBD] y repeticiones ricas en leucina [LRR]); una proteína adaptadora ASC (proteína asociada a la apoptosis con un dominio CARD); y un zimógeno inactivo, la pro-Caspasa-1<sup>29</sup>.

La activación de los inflamasomas promueve el clivaje de la pro-Caspasa-1 a su forma activa (Caspasa-1) en el caso de los inflamasomas canónicos, o dan lugar a la activación de Caspasa-11 (ratón) o caspasa-4/5 (humanos) en los inflamasomas no-canónicos<sup>30</sup>. Esta activación promueve a su vez el clivaje proteolítico de los precursores de las citoquinas pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 para liberar sus formas activas (IL-1 $\beta$ , IL-18) y gatillar respuestas pro-inflamatorias y antimicrobianas. En particular, la IL-1 $\beta$ , es considerada una citoquina clave que participa de manera crítica en diversos eventos asociados a la activación y regulación de la inflamación<sup>31</sup>. Asimismo, la Caspasa-1 también cliva a la Gasdermina D (GSDMD), liberando su dominio N-terminal. Este dominio puede formar poros en la membrana celular e inducir un proceso de muerte celular inflamatoria conocido como “piroptosis”<sup>23,32</sup>. La piroptosis, además, favorece la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18 por una vía no canónica<sup>23,29</sup>.

Entre los distintos inflamasomas, el más estudiado es el inducido por el receptor NLRP3. Esto se debe posiblemente a su participación en la inmunidad contra una gran variedad de patógenos, pero también a su rol patogénico en distintas enfermedades auto-inflamatorias o enfermedades inflamatorias crónicas<sup>23-28</sup>. La activación del inflamasoma NLRP3 puede ser desencadenada por diversos estímulos y es un proceso que ocurre en dos pasos como se ilustra en la

Figura 1. En primer lugar se requiere una señal de “priming” o sensibilización (señal 1). Esta señal suele ser disparada por moléculas microbianas, como ligandos de receptores tipo toll (TLRs), de receptores NLRs (ej. NOD1, NOD2), o la señalización por citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que activan al factor de transcripción NF- $\kappa$ B y promueven así la transcripción del NLRP3, la pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18<sup>33,34</sup>. Además de esta regulación transcripcional, se ha reportado que la señal 1 podría actuar a nivel post-transcripcional, al promover la desubiquitinación o fosforilación del NLRP3 y favorecer el ensamblado del complejo macromolecular<sup>35,36</sup>. En segundo lugar, ocurre la señal de activación (señal 2) que implica el censado de agonistas del inflamasoma NLRP3, así como su ensamblaje y activación<sup>37</sup>.



**Figura 1. Activación del inflamasoma NLRP3.** La activación del inflamasoma canónico de NLRP3 requiere dos señales: La señal 1 (“priming”) involucra la activación de NF- $\kappa$ B inducida por PAMPs o citoquinas y regula al alta la expresión génica de NLRP3 y las citocinas proinflamatorias. La señal 2 es proporcionada por diversos PAMPs y DAMPs; estos activan múltiples eventos de señalización río arriba, como el eflujo de K<sup>+</sup>, el flujo de Ca<sup>2+</sup>, el eflujo de Cl<sup>-</sup>, la producción de mtROS, la liberación de ADN mitocondrial oxidado, el daño lisosomal y desensamblaje del aparato de Golgi (red trans-Golgi dispersa). El ensamblaje del inflamasoma de NLRP3 desencadena la autoescisión de la caspasa-1, que a su vez escinde pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18. La caspasa-1 activa también escinde GSDMD y libera GSDMD-N de la autoinhibición, y el GSDMD-N libre se oligomeriza en las membranas para formar poros e inducir piroptosis. Extraído de Zhan et. al., *Frontiers in Immunology* 2023.

A diferencia de otros receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), que sólo reconocen uno o múltiples estímulos estructuralmente similares, el NLRP3 puede ser activado por una amplia gama de estímulos como bacterias gram-positivas, virus, viroporinas, toxinas formadoras de poros, cristales, ATP, entre otros <sup>23,38</sup>. En este sentido, si bien algunos agonistas como el ATP pueden ser reconocidos directamente por el NLRP3 <sup>39</sup>, la mayor parte de estos inducen uno o más eventos celulares comunes que desencadenan la activación del inflamasoma NLRP3 <sup>23</sup>. Entre estos eventos moleculares o celulares, se incluyen la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), la liberación de ADN mitocondrial (mtDNA) o cardiolipina, y la disrupción del compartimento lisosomal, que preceden la activación del inflamasoma <sup>40-43</sup>. Además, los flujos iónicos, como el eflujo de potasio ( $K^+$ ), la movilización del calcio ( $Ca^{2+}$ ), el influjo de sodio ( $Na^+$ ) y el eflujo de cloruro ( $Cl^-$ ) se han señalado como eventos cruciales en la activación del NLRP3 <sup>44-47</sup>. Por la relevancia de los mecanismos iónicos en esta tesis, pasaremos a profundizar el rol de cada uno de los iones mencionados en la activación del inflamasoma NLRP3.

El eflujo de  $K^+$  es un evento ampliamente aceptado como mecanismo activador para distintos agonistas del inflamasoma NLRP3 como lo son el ATP, toxinas bacterianas como la Nericina o elementos particulados, como los cristales de urato monosódico y los cristales de colesterol <sup>23,44,48</sup>. Este evento se explica por las diferencias de concentración de  $K^+$  entre el citosol (140 mM) y el medio extracelular (5 mM), lo que favorece su salida al medio extracelular <sup>23</sup>. Asimismo, concentraciones altas de  $K^+$  en el medio extracelular inhiben la activación del inflamasoma por estos agonistas. Los distintos agonistas inducen el eflujo de  $K^+$  por diversos mecanismos. Por ejemplo, el ATP extracelular actúa sobre el receptor purinérgico P2X7, provocando la apertura de un canal iónico que permite la salida de  $K^+$ <sup>49</sup>. Di et. al. reportaron que este canal iónico sería TWIK2<sup>50</sup>, mientras que nuestro grupo propuso un rol para los canales de  $K^+$  operados por  $Ca^{2+}$  (KCa), en particular KCa1.1 <sup>51,52</sup>. Por otro lado, la nericina, una toxina bacteriana, forma poros en la membrana plasmática, lo que facilita el transporte pasivo de  $K^+$  hacia el medio extracelular <sup>23,53</sup>. El mecanismo por el que el eflujo de  $K^+$  promovería

la activación del inflamasoma NLRP3 aún es debatido, pero se ha especulado que este evento permitiría la unión de una quinasa “NEK7” (del inglés: “Never In Mitosis A-Related Kinase 7) al NLRP3, lo que constituye un paso clave en el ensamblaje de este complejo macromolecular <sup>54</sup>. También se ha especulado que el eflujo de K<sup>+</sup> promovería la activación del inflamasoma NLRP3 al inducir la disfunción mitocondrial y la producción de especies reactivas del oxígeno mitocondriales (mtROS) <sup>46</sup>. Si bien este mecanismo es necesario para los distintos agonistas mencionados, este no es el caso de algunas moléculas pequeñas como el imiquimod, que son capaces de activar al inflamasoma NLRP3 de forma independiente del eflujo de K<sup>+</sup> <sup>55</sup>.

La movilización del Ca<sup>2+</sup>, especialmente su incremento a nivel citosólico, resulta esencial para la activación del inflamasoma NLRP3 <sup>56</sup>. De hecho, el quelado del Ca<sup>2+</sup> con BAPTA-AM es capaz de inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 y la secreción de IL-1 $\beta$  <sup>57,58</sup>. Este influjo puede desencadenarse por la entrada de Ca<sup>2+</sup> desde el medio extracelular o por su liberación desde depósitos intracelulares, como el retículo endoplásmico. Se han propuesto dos mecanismos para explicar cómo los iones de Ca<sup>2+</sup> modulan la activación del inflamasoma NLRP3. Una posibilidad, propuesta por Lee *et. al.* es que el Ca<sup>2+</sup> promovería la interacción del NLRP3 con el adaptador ASC, sin embargo, los mecanismos por los que esto ocurriría aún no son claros <sup>59</sup>. Otro mecanismo propuesto, es que el exceso del Ca<sup>2+</sup> en el citoplasma induciría una disfunción mitocondrial, provocando la liberación de ROS, ADN mitocondrial y la transferencia de cardiolipina de la membrana mitocondrial interna a la externa, favoreciendo así la activación del inflamasoma NLRP3 <sup>45,60</sup>.

El eflujo de Cl<sup>-</sup> también constituye un mecanismo de activación del inflamasoma NLRP3. A diferencia del K<sup>+</sup>, las concentraciones de Cl<sup>-</sup> son mucho más bajas en el medio intracelular (5-15 mM) que en el extracelular (110-130 mM) lo que genera un gradiente electroquímico que favorece la entrada de este ion a la célula en condiciones normales <sup>23</sup>. Sin embargo, distintos activadores del inflamasoma NLRP3 como el ATP o la Nigericina inducen el eflujo de Cl<sup>-</sup>, lo que sugiere un rol para el cloruro en la regulación del inflamasoma NLRP3 <sup>46</sup>. En

acuerdo, la remoción de este ion del medio extracelular es capaz de aumentar la secreción de IL-1 $\beta$  dependiente de ATP <sup>61</sup>. Además, el eflujo de Cl $^-$  representaría un evento corriente-abajo del eflujo de K $^+$  y la disfunción mitocondrial, posicionándolo como un evento proximal a la activación del inflamasoma NLRP3 <sup>46</sup>. Este proceso estaría mediado principalmente por canales específicos como los CLICs (Del inglés: *chloride intracellular channels*) y los VRACs (Del inglés: *volume-regulated anion channels*), que se activan en respuesta a cambios en el volumen celular o señales de daño <sup>46</sup>. El mecanismo por el que el eflujo de Cl $^-$  contribuye a la activación del inflamasoma aún es discutido, pero una de las teorías más aceptadas serían que este fenómeno promueve la interacción entre la proteína NEK7 y NLRP3, y así favorece el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 <sup>46</sup>.

Finalmente, los iones sodio (Na $^+$ ) también han sido propuestos como participantes en la activación del inflamasoma NLRP3, aunque su rol es menos claro. Si bien el influjo de Na $^+$  no es suficiente para activar al inflamasoma NLRP3, este cooperaría con el eflujo de K $^+$ . En acuerdo, la activación inducida por medios sin K $^+$  y estímulos como la gramicidina y nigericina puede ser bloqueada al disminuir la concentración extracelular de Na $^+$  o inhibir su entrada <sup>44,62</sup>. En este sentido, se ha especulado que en ciertas circunstancias, el eflujo de K $^+$  requiere un influjo de Na $^+$  al citosol a través del canal iónico “ENaC” (Del inglés: *Epithelial sodium (Na) Channel*) para mediar la activación del inflamasoma <sup>63</sup>. Por otro lado, se ha propuesto que el Na $^+$  podría regular la activación del inflamasoma a través del intercambiador mitocondrial de Na $^+$ /Ca $^{2+}$ , influyendo sobre la homeostasis mitocondrial, la producción de mtROS y la integridad de este organelo <sup>64</sup>.

En su conjunto, los mecanismos iónicos no son eventos aislados, sino que actúan de forma coordinada con otros procesos celulares, como el daño mitocondrial, la producción de ROS y la presencia de señales asociadas al peligro. Si bien se han dado avances significativos en la comprensión de los diferentes agonistas y mecanismos que activan el inflamasoma NLRP3, el mecanismo preciso mediante el cual el NLRP3 detecta estos estímulos, así como el proceso por el cual se ensambla y activa el inflamasoma, continúan siendo objeto de debate. Comprender en profundidad estos mecanismos tiene el potencial de desarrollar

nuevos agentes terapéuticos en aquellas enfermedades donde la activación del inflamasoma media la inflamación y contribuye a la patología. Específicamente, si bien sabemos que la homeostasis iónica juega un papel central en la regulación del inflamasoma, desconocemos aún cómo intervenir farmacológicamente canales iónicos y de esa manera controlar a los inflamasomas.

## 2.2 *El inflamasoma NLRP3 en el escenario fisiopatológico*

En circunstancias normales, la activación del inflamasoma NLRP3 ocurre frente a la infección por organismos patógenos y contribuye a la defensa del huésped. Sin embargo, en ocasiones, la activación disfuncional o excesiva de este complejo puede ser perjudicial y se ha asociado con distintas enfermedades. Entre estas, las mutaciones en distintos componentes del inflamasoma NLRP3 suelen ser la principal causa en la desregulación de su activación y llevan a enfermedades asociadas con la respuesta inflamatoria como son los síndromes autoinflamatorios. Una de las patologías clásicas asociadas a su disfunción son los síndromes periódicos asociados a la criopirina (CAPS), un grupo de enfermedades autoinflamatorias raras que incluye el síndrome autoinflamatorio familiar por frío (FCAS), el síndrome de Muckle-Wells (MWS) y la enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal (NOMID) <sup>65</sup>. En estas patologías, existen mutaciones de ganancia de función en el gen *NLRP3* u otros componentes del inflamasoma que causan su activación continua, induciendo la producción excesiva de IL-1 $\beta$  y una inflamación sistémica descontrolada.

Además, el inflamasoma NLRP3 también se ha implicado en enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Un ejemplo de ello es la gota, donde la acumulación de cristales de urato monosódico en las articulaciones activa al inflamasoma NLRP3, promueve la liberación de IL-1 $\beta$  y desencadena una respuesta inflamatoria articular dolorosa característica de la enfermedad <sup>66,67</sup>. De manera similar, en la aterosclerosis, los cristales de colesterol y otros productos asociados a la dislipidemia crónica activan al inflamasoma NLRP3, donde la IL-1 $\beta$  e IL-18 favorecen la formación de placas y lesiones ateroscleróticas, contribuyendo al riesgo de eventos cardiovasculares <sup>68</sup>.

En enfermedades de etiología viral, la activación exacerbada del inflamasoma NLRP3 se ha asociado con el daño y la severidad. Este es el caso en la infección por HCV (Del inglés: *Hepatitis C Virus*) donde promueve la inflamación y el daño en el hígado <sup>69</sup>. Además, en la infección por RSV (Del inglés: *Respiratory Syncytial Virus*) y CMV (Del inglés: *Cytomegalovirus*) la activación de este complejo promueve la inmunopatología pulmonar <sup>70,71</sup>. Este es también el caso de la infección por SARS-CoV-2 (Del inglés: *Severe Acute Respiratory Syndrome 2*), donde la activación de la Caspasa-1, así como la secreción IL-1 $\beta$  e IL-18 se han asociado con la COVID-19 severa <sup>72</sup>. En ese contexto, mucho menos explorada ha sido la posibilidad de que una respuesta inflamatoria exacerbada interfiera con la respuesta adaptativa anti-viral <sup>73,74</sup>.

Finalmente, el inflamasoma NLRP3 se ha implicado en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas. Un ejemplo de ello es la enfermedad de Alzheimer donde la acumulación de  $\beta$ -amiloide puede ser reconocida como DAMPS y activar al inflamasoma NLRP3 en la microglía, promoviendo un fenotipo neurotóxico en estas células <sup>27,75</sup>. Asimismo, en la enfermedad de Parkinson la activación del inflamasoma NLRP3 se ha asociado con el proceso neurodegenerativo y su inhibición mejora la patología de la enfermedad <sup>76</sup>. Este también es el caso de la esclerosis múltiple, que será profundizado más adelante en esta tesis, donde la IL-1 $\beta$  e IL-18 promueven el infiltrado de células inmunes el sistema nervioso central (SNC), agravando así el proceso neurodegenerativo e inflamatorio <sup>75,77</sup>.

En resumen, el inflamasoma NLRP3 actúa como un mediador crítico de la inflamación en una amplia gama de enfermedades. En este sentido, su capacidad para responder a diferentes estímulos y desencadenar respuestas inflamatorias potentes lo posiciona como un componente crucial para entender los mecanismos asociados a patologías mediadas por la inflamación.

### 3. La Inflamación como regulador de respuestas mediadas por linfocitos T.

Hasta el momento hemos descrito cómo la inflamación modula y es mediada por componentes de la inmunidad innata. Sin embargo, esta también tiene un rol importante en la inducción de la inmunidad adaptativa, particularmente en la activación de linfocitos T y de linfocitos B. A efectos de este trabajo de tesis, nos centraremos en el rol del proceso inflamatorio sobre la modulación de los linfocitos T.

Como fue mencionado en capítulos anteriores, la inflamación tiene la capacidad de desencadenar la respuesta inmune adaptativa. Este proceso comienza con la activación de células del sistema inmune innato como las células dendríticas. Estas células son las encargadas de procesar y presentar antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T vírgenes o “naive”, y en el caso de peligro inmunológico secretan citoquinas pro-inflamatorias y expresan moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86<sup>78,79</sup>. La presentación de antígenos, junto con las señales co-estimuladoras favorecen la activación de linfocitos T vírgenes hacia un perfil efector<sup>78,79</sup>. Dependiendo del estímulo inflamatorio inicial, el perfil de citoquinas guía esta diferenciación hacia distintos fenotipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores (Th1, Th2, Th17) o linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, que colaboran con la erradicación del agente patogénico<sup>78,79</sup>.

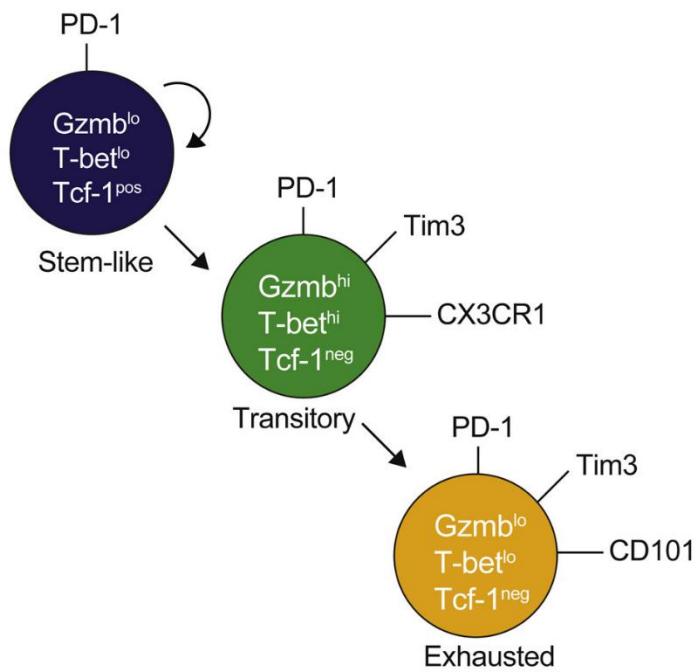
Sin embargo, cuando el proceso inflamatorio ocurre de forma desregulada o exacerbada, estos linfocitos T pueden contribuir a la patología por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Asimismo, los procesos inflamatorios agudos y crónicos pueden modular a los linfocitos T y afectar su capacidad efectora. Esto es evidenciado en el proceso de inflamación aguda como en el que se da en un cuadro clínico de sepsis. Se ha reportado que luego de la sepsis los linfocitos T CD8<sup>+</sup> presentan un estado disfuncional, caracterizado por una capacidad disminuida para controlar infecciones, así como para responder frente a nuevos antígenos<sup>80,81</sup>.

Asimismo, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria que sobreviven post-sepsis tienen una menor sensibilidad para el reconocimiento antigénico, capacidad proliferativa y producen menos citoquinas pro-inflamatorias <sup>81,82</sup>. Por otro lado, se ha propuesto que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con sepsis presentan un estado global de anergia (o inactivación funcional), evidenciado por la casi nula producción de citoquinas tras la estimulación con anti-CD3/CD28 <sup>82-84</sup>, junto con una menor capacidad proliferativa y disminución en el ARN mensajero para factores de transcripción como T-bet, GATA-3 y RORYT, que regulan la diferenciación en linfocitos Th1, Th2 y Th17 <sup>85,86</sup>. Además, expresan altos niveles de receptores inhibitorios como PD-1, 2B4, BTLA y TRAIL <sup>82,87-90</sup>, lo que limita su cooperación con CD8<sup>+</sup> y células B <sup>86,90,91</sup>. Este fenotipo también comparte características con las células T agotadas o “exhaustas”, un linaje disfuncional de linfocitos caracterizado por una pérdida progresiva de funciones efectoras, expresión de receptores inhibidores y programas metabólicos, transcriptómicos y epigenéticos particulares <sup>82,92</sup>. Este fenotipo se ha descripto principalmente para los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el contexto de infecciones virales crónicas o cáncer <sup>93</sup> y será retomado más adelante en esta tesis.

La modulación de los linfocitos T también se ha reportado en contextos de inflamación crónica. La inflamación crónica puede promover la hiperactivación de los linfocitos T, favoreciendo respuestas efectoras exageradas y la producción sostenida de citoquinas pro-inflamatorias que favorecen el estado de cronicidad. En estos escenarios, las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se ven afectadas, destacándose la modulación de poblaciones Th17 y T reguladoras (Treg) <sup>94,95</sup>. Además, los linfocitos Th17 tienen aspectos ontogénicos y funcionales muy cercanos a las células T reguladoras, donde la presencia de TGF-β promueve la diferenciación a células T reguladoras, pero la adición de IL-6 favorece la de células Th17 <sup>97</sup>. En enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea, el aumento de citoquinas como la IL-6 promueve la diferenciación de células Th17 frente a la de T reguladoras, de carácter protector <sup>98</sup>. A su vez, las células Th17 son de naturaleza plástica y/o heterogénea y pueden diferenciarse hacia células Th17 reguladoras (Th17<sub>reg</sub>) o efectoras patogénicas (Th17<sub>eff</sub>) según el entorno citoquínico

que las rodea<sup>99</sup>. Por ejemplo, en la enfermedad inflamatoria intestinal, la presencia de IL-23 promueve un fenotipo Th17<sub>eff</sub>, con mayor secreción de IL-17 e IFN- $\gamma$ , que exacerba el proceso inflamatorio<sup>100</sup>. En esta modulación, la activación del inflamasoma también tendría un rol clave, puesto que la IL-1 $\beta$ , junto con la IL-6 e IL-23 es capaz de inducir la diferenciación de células Th17<sub>eff</sub> de forma independiente de TGF- $\beta$ <sup>101</sup>.

Por otro lado, en ciertos contextos fisiopatológicos la persistencia del estímulo antigénico y el microambiente inflamatorio puede impedir el desarrollo de linfocitos T efectores funcionales, e inducir fenómenos de agotamiento celular en las células T. Este fenómeno ha sido reportado y caracterizado especialmente para las células T CD8<sup>+</sup> en el contexto del cáncer e infecciones virales crónicas, mientras que su rol en el contexto de la autoinmunidad es más discutido y poco explorado<sup>102-104</sup>. Como se mencionó anteriormente, las células T CD8<sup>+</sup> agotadas o exhaustas son un linaje disfuncional de linfocitos<sup>92</sup>. A grandes rasgos, se han definido tres subconjuntos: i) Células progenitoras exhaustas (T<sub>pex</sub>) “stem-like” con capacidades de autorrenovación y persistencia a largo plazo que pueden dar lugar a las otras sub-poblaciones ii) Células T CD8<sup>+</sup> exhaustas transitorias de vida corta, citotóxicas y iii) células T CD8<sup>+</sup> terminalmente exhaustas, carentes de función efectora como se ilustra en la Figura 2<sup>105-111</sup>.



**Figura 2. Sub-poblaciones de células T exhaustas.** Se muestran las tres sub-poblaciones de células T exhaustas. En primer lugar, las células "stem-like" o progenitoras (PD-1<sup>+</sup>Gzmb<sup>lo</sup>T-bet<sup>lo</sup>Tcf-1<sup>+</sup>) que poseen capacidad de autorrenovación y persistencia a largo plazo, actuando como precursores de las demás subpoblaciones; luego las células T CD8<sup>+</sup> exhaustas transitorias (PD-1<sup>+</sup>Gzmb<sup>hi</sup>T-bet<sup>hi</sup>Tcf-1<sup>-</sup> Tim3<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup>), de vida corta y con actividad citotóxica y finalmente las células T CD8<sup>+</sup> terminalmente exhaustas, que carecen de función efectora (PD-1<sup>+</sup>Gzmb<sup>lo</sup>T-bet<sup>lo</sup>Tcf-1<sup>-</sup> Tim3<sup>+</sup> CD101<sup>+</sup>). *Extraído y adaptado de Hudson et. al., Immunity, 2019.*

El desarrollo de estas células implica, además de la persistencia antigénica, la presencia de mediadores solubles que son aportados por el contexto inflamatorio crónico. La IL-10, por ejemplo, es inducida en distintas infecciones crónicas y en el cáncer, y su bloqueo previene o revierte el desarrollo del agotamiento <sup>93,112,113</sup>. La secreción de TGF-β también se ha implicado en el agotamiento, al suprimir la función T efectora a través de factores de transcripción SMAD <sup>93</sup>. En infecciones virales crónicas, la expresión de TGF-β y/o la activación de SMAD2 son características asociadas a los linfocitos T exhaustos <sup>93,114</sup>. A su vez, los interferones de tipo 1 (IFN-α/β), también tendrían un rol en el agotamiento. En contextos de inflamación crónica, estas citoquinas que normalmente contienen la infección viral, inducen la expresión de IL-10, IDO e inhibidores de la co-estimulación como PD-L1 que regulan las respuestas T efectoras <sup>115</sup>. En acuerdo, en infecciones crónicas por LCMV (Del inglés: *Lymphocytic Choriomeningitis Virus*) el bloqueo de IFN-α/β, redujo los niveles de IL-10, disminuyó la cantidad de células dendríticas PD-L1<sup>+</sup> y mejoró el control de la infección viral <sup>116,117</sup>. Además, altas concentraciones de IFN-α/β puede promover la diferenciación de células terminalmente exhaustas <sup>118</sup>. Estas observaciones, aunque paradójicas, sugieren que los interferones de tipo I fomentarían el agotamiento de células T al inducir circuitos inmunosupresores. Finalmente, nuestro grupo ha propuesto que la activación del inflamasoma NLRP3 también podría tener un rol en el agotamiento de los linfocitos T <sup>119</sup>. En acuerdo, la activación del inflamasoma NLRP3 promovió la diferenciación de T<sub>pe</sub>x a linfocitos terminalmente exhaustos en un modelo murino de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello <sup>120</sup>.

En conjunto, la inflamación y la activación del inflamasoma NLRP3 pueden desencadenar respuestas inmunes patológicas al modular poblaciones clave como los linfocitos T. A continuación, abordaremos dos escenarios fisiopatológicos de especial interés en esta tesis, donde la inflamación —y en particular el inflamasoma— desempeñan un papel fundamental: por un lado, las infecciones virales, haciendo hincapié en la infección severa por β-coronavirus, y por otro, la esclerosis múltiple, enfermedad autoinmune de carácter neurodegenerativo.

## 4. La inflamación severa en la interfase hospedero-patógeno: infección por $\beta$ -Coronavirus

### 4.1 La respuesta inflamatoria en la infección por $\beta$ -Coronavirus

La infección por  $\beta$ -coronavirus, como el SARS-CoV-2 o SARS-CoV (Del Inglés: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2/1*), representa un buen ejemplo de un contexto fisiopatológico donde la severidad de la enfermedad no deriva únicamente de la infección *per se*, sino de una respuesta inflamatoria desregulada frente a la misma. En los casos graves, la inflamación, a través de distintos actores de la inmunidad innata y adaptativa, no solo falla en controlar la propagación viral sino que además resulta en la principal causa del daño tisular y sistémico<sup>73</sup>.

Los  $\beta$ -coronavirus son un subtipo de la familia *Coronaviridae*, compuesta por virus envueltos de ARN simple cadena de polaridad positiva, con una longitud aproximada de 30 Kbp. Estructuralmente, están formados por las proteínas *spike* (S), *envelope* (E), *membrane* (M) y *nucleocapsid* (N)<sup>121,122</sup>. Los coronavirus tienen una amplia gama de huéspedes, y dentro del subtipo de  $\beta$ -coronavirus, el SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS (Del inglés: *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) infectan humanos. Por otro lado, dentro de los CoVs que no infectan humanos, destacan algunos como el virus de la hepatitis murina (MHV), que mimetiza distintos aspectos de la biología de los coronavirus humanos<sup>121,122</sup>. Estos han permitido sobrepasar el desafío de la especificidad de los coronavirus humanos, y representan un modelo ideal para estudiar la patogénesis y respuesta inmune frente a los distintos coronavirus<sup>122</sup>.

La infección por  $\beta$ -coronavirus suele ser mediada por la proteína S que en el caso del SARS-CoV y SARS-CoV2 se une al receptor ACE2 (Del Inglés: *Angiotensin Converting Enzyme 2*) humano y permite el ingreso a células alveolares epiteliales, vasculares endoteliales y macrófagos en el pulmón<sup>123-125</sup>. Una vez dentro de la célula, los motivos virales pueden ser reconocidos por PRRs como el TLR-7, RIG-I y MDA5 que activan la vía de los interferones (IFN) de tipo I y III en forma dependiente de IRF-3/IRF-7, así como la producción de citoquinas pro-inflamatorias en forma

dependiente del factor de transcripción NFkB (Del Inglés; *Nuclear factor κB*) <sup>122</sup>. Dentro de estas citoquinas podemos encontrar la IL-6, TNF-α y productos derivados de la activación del inflamasoma como la IL-1β e IL-18. Este patrón de secreción de citoquinas ocurre para los distintos β-coronavirus humanos, como el SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS, pero también para el β-coronavirus murino MHV <sup>122</sup>. En este sentido, el SARS-CoV induce la activación directa del inflamasoma a través de proteínas virales como la proteína E y 3a <sup>126,127</sup>. Por su parte, la infección por MHV promueve la secreción de IL-1β e IL-18 en macrófagos derivados de la médula ósea (BMDMs) <sup>128</sup>. En cuanto al SARS-CoV-2, se ha reportado que las viroporinas ORF3a, E y M serían capaces de activar al inflamasoma NLRP3 <sup>129</sup>. La proteína E tendría un rol dual en la regulación del inflamasoma, fomentando su activación en etapas tardías de la infección <sup>130</sup>. El SARS-CoV-2 también promueve la inflamación al inducir la muerte celular por piroptosis, promoviendo así la liberación de DAMPs como el ATP, ácidos nucleicos y oligómeros ASC. Estos motivos pueden ser reconocidos por células epiteliales del tejido y también favorecer la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, IP-10, MIP1α, MIP1β y MCP-1 <sup>73</sup>.

El conjunto de citoquinas liberadas induce un influjo de leucocitos, principalmente monocitos, macrófagos y linfocitos T al sitio de infección. Estas células, por su parte, incrementan la secreción de citoquinas proinflamatorias y establecen un círculo de retroalimentación positiva <sup>73</sup>. En una respuesta inmune adecuada los leucocitos logran erradicar al virus, evitan la diseminación de la infección, la respuesta inmune se resuelve y los pacientes se recuperan. Sin embargo, en algunos pacientes ocurre una respuesta inmune disfuncional, donde las células reclutadas al pulmón atraen más leucocitos, inducen una producción exacerbada de citoquinas pro-inflamatorias y ocasionan daño tisular <sup>131,132</sup>. En la infección por SARS-CoV-2 ocurre un daño alveolar difuso, mediado principalmente por la secreción excesiva de proteasas y ROS, así como por la replicación viral. Este daño alveolar incluye la descamación de células alveolares, formación de membranas hialinas y edema pulmonar, que conducen al síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, del inglés: *Acute Respiratory Disease Syndrome*) <sup>131,132</sup>. El desarrollo de ARDS se caracteriza por dificultad para respirar y bajos niveles de

oxígeno en sangre. Como resultado, algunos pacientes pueden sucumbir a infecciones bacterianas y fúngicas secundarias <sup>133</sup>. Además, el desarrollo de ARDS puede conducir a insuficiencia respiratoria, la cual es la causa de muerte en el 70% de los casos fatales de COVID-19 <sup>133</sup>. Por otro lado, la liberación masiva de citoquinas puede desencadenar una tormenta de citoquinas que actúa no solo a nivel local, sino que induce manifestaciones sistémicas y extra-pulmonares en otros órganos. Los niveles altos de citoquinas como el TNF- $\alpha$  pueden causar shock séptico y falla multi-órgánica, especialmente en los sistemas cardíaco, hepático y renal. Esto coincide con el daño miocárdico y la falla multiorgánica observada en algunos pacientes <sup>134</sup>. La importancia de la respuesta inflamatoria descontrolada es tal, que este fenómeno suele ser responsable del 28% de las muertes por COVID-19 <sup>135</sup>. En este sentido, muchos tratamientos destinados a mitigar la enfermedad severa se han centrado en controlar la respuesta inflamatoria. Entre ellas, los corticoides y antagonistas de la IL-6 como el tocilizumab han sido aprobados para el tratamiento de la enfermedad <sup>136,137</sup>. Además, existen ensayos clínicos contra agentes dirigidos contra el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), donde el Lenzilumab provoca una mejoría significativa en la supervivencia libre de ventilación invasiva en el grupo tratado <sup>138</sup>. De todos modos, si bien existe un consenso en el rol de la respuesta inflamatoria en las enfermedades severas por coronavirus, con la COVID-19 como principal referente, los mecanismos precisos que explican la severidad y ocurrencia de respuestas inmunes disfuncionales son variados y serán discutidos en el siguiente apartado.

#### *4.2 Mecanismos asociados a la severidad*

La incapacidad para generar una respuesta inmune adecuada y eficiente frente a los  $\beta$ -coronavirus es un fenómeno multifactorial. En este contexto, nos centraremos específicamente en los mecanismos predominantes durante la infección por SARS-CoV-2. En primer lugar, se hipotetizó que la carga viral tendría un rol como predictor de la severidad, sin embargo este rol ha sido discutido y la discrepancias entre distintos estudios, la dinámica viral y posiblemente estrategias

de muestreo no han permitido saldar cuál es su contribución exacta <sup>139</sup>. A nivel de la inmunidad innata, los defectos en la respuesta de IFN- $\beta$  podrían desempeñar un rol en la severidad de la COVID-19, puesto que estas citoquinas son claves en los primeros estadios para contener y limitar la infección viral. En concordancia, se han observado polimorfismos de pérdida de función para genes asociados a la vía del IFN- $\beta$  en algunos pacientes graves <sup>140</sup>. Además, se ha reportado la presencia de auto-anticuerpos contra el IFN- $\alpha$  e IFN- $\omega$  en pacientes con cuadros severos, lo que se ha asociado con un retraso en la eliminación viral <sup>141-143</sup>. Por otro lado, la vía del inflamasoma NLRP3 también tendría un rol patogénico en la enfermedad. En un estudio de pacientes con COVID-19 moderada y severa se observó que el inflamasoma estaba activado en tejidos de pacientes post-mortem y en células mononucleares de sangre periférica <sup>72</sup>. De manera interesante, en este estudio se observó que la presencia de Caspasa-1 activa e IL-18 en el suero se correlacionó con una mayor gravedad de la enfermedad y un peor desenlace clínico <sup>72</sup>. Además, en un estudio de cohorte retrospectiva, el bloqueo de la IL-1 $\beta$  con anakinra se asoció una mejoría clínica <sup>144</sup>. La vía del inflamasoma NLRP3 representaría entonces un posible biomarcador y/o blanco terapéutico en el contexto de esta enfermedad.

Por otra parte, la severidad clínica se ha asociado con respuestas inmunes adaptativas ineficientes y desbalanceadas. Para empezar, se han observado defectos en respuestas inmunes de tipo 1 y un exceso de respuestas de tipo 2 en pacientes con COVID-19 severa <sup>145,146</sup>. A su vez, en pacientes severos se ha reportado una expansión sustancial de plasmocitos, que en algunos casos se asocia con respuestas B extrafolículares <sup>147</sup>. Por otra parte, se observa una linfopenia T profunda, que podría ser explicada por el reclutamiento de células T a los tejidos o la inducción de su apoptosis por el aumento en citoquinas pro-inflamatorias <sup>139,145,148</sup>. Esto contribuiría, al menos en parte, con respuestas T defectuosas para la eliminación viral. Para complejizar aún más este asunto, algunos autores reportaron que los linfocitos T CD8 $^{+}$  tendrían un estado disfuncional, aunque este es un asunto controvertido. En los casos severos de COVID-19, se observó que los linfocitos T reportaron una menor diversidad

funcional y un aumento de marcadores de agotamiento (PD-1, CTLA-4, TIGIT)<sup>149</sup>. En este artículo, los autores hipotetizaron que un agotamiento excesivo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> podría perjudicar la respuesta inmune celular contra el SARS-CoV-2<sup>149</sup>. En acuerdo, otro estudio reportó que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes con SARS-CoV-2 mostraron un aumento para el receptor inhibidor NKG2A asociado con el agotamiento celular en linfocitos T y disfunción en células NK<sup>150</sup>. En esa misma línea, en infecciones agudas por SARS-CoV-2, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de sangre periférica mostraron una pérdida funcional, que se caracterizó por una menor secreción de IFN-γ y TNF-α, junto con una capacidad citotóxica disminuida<sup>148</sup>. En contraposición, otros autores sostienen que las células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> virus-específicas, que se han presumido como exhaustas, serían funcionales y no estarían agotadas en pacientes con COVID-19<sup>151</sup>. Por tanto, el rol de los linfocitos T exhaustos en la infección por SARS-CoV-2 es controversial y su potencial efecto patogénico requiere una mayor caracterización. En este contexto, resulta crucial determinar si estos linfocitos T están realmente exhaustos y, de ser así, identificar los factores que contribuyen a este estado. En particular, no es claro cómo el fenómeno hiperinflamatorio podría influir en la inmunidad mediada por células T en esta patología. Sin embargo, en contextos hiperinflamatorios similares, como la sepsis, se ha demostrado una disfunción de células T y un potencial beneficio terapéutico de anticuerpos anti-PD-1<sup>152</sup>. Estas terapias, ampliamente utilizadas en oncología, buscan restaurar la función citotóxica de los linfocitos T mediante el bloqueo de puntos de control inmunológico, como la interacción entre PD-1 y su ligando PD-L1<sup>153</sup>. Este enfoque terapéutico ha demostrado ser efectivo en la modulación del agotamiento de linfocitos T, mejorando la sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad en pacientes con cáncer<sup>154</sup>. En ese sentido, si los linfocitos T estuviesen realmente exhaustos en la infección por β-coronavirus, podrían beneficiarse de esas terapias. Finalmente, dado que gran parte de esta investigación se ha hecho en SARS-CoV-2, sería interesante explorar qué sucede en otros β-coronavirus para entender si el agotamiento es un fenómeno de carácter conservado que se asocia a la severidad en la infección por estos patógenos.

En resumen, la severidad en la infección por  $\beta$ -coronavirus, especialmente en la infección por SARS-CoV-2, está dada por fenómenos de hiperinflamación como la activación del inflamasoma, respuestas inmunes innatas deficientes o exacerbadas y respuestas inmunes adaptativas disfuncionales. En ese sentido, entender cómo estos distintos mecanismos interactúan entre sí y contribuyen a la severidad tiene el potencial de mejorar el tratamiento en pacientes que cursan cuadros graves en infecciones por  $\beta$ -coronavirus. Del mismo modo, identificar factores protectores del huésped que puedan regular la hiperinflamación – inducida por coronavirus – potenciaría el desarrollo de terapias que puedan controlar la enfermedad severa y la inmunopatología observada en la infección viral.

## 5. La inflamación descontrolada en el contexto de la autoinmunidad: El caso de la Esclerosis Múltiple (EM)

### 5.1 Definición y etiología de la EM

La no resolución de la inflamación puede resultar en cuadros severos en patologías de carácter infeccioso, así como promover el desarrollo y la cronicidad en enfermedades autoinmunes. En estos contextos, la respuesta inmune inflamatoria actúa como el eje central que guía la activación, el reclutamiento y la persistencia de las respuestas inmunes patológicas. Este fenómeno es particularmente relevante en la Esclerosis Múltiple (EM), una enfermedad autoinmune que afecta el Sistema Nervioso Central (SNC), caracterizada por la inflamación crónica, desmielinización, gliosis y pérdida neuronal<sup>155</sup>. Se estima que alrededor de 3 millones de personas en el mundo sufren esta enfermedad, con tasas de prevalencia particularmente altas en Argentina y Uruguay, alcanzando 25 y 21 cada 100,000 habitantes respectivamente en Latinoamérica<sup>156,157</sup>. Además, como sucede con muchas patologías autoinmunes, tiene una mayor prevalencia en mujeres y se da una fuerte reducción en la actividad de la enfermedad durante el embarazo<sup>156,158</sup>.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son heterogéneas y dependen del sitio donde ocurren las lesiones en el SNC. Entre los síntomas se incluyen alteraciones sensoriales y visuales; deterioro motor y de la coordinación, así como fatiga, dolor y déficits cognitivos<sup>159,160</sup>. Clínicamente, se clasifica en varios subtipos, incluyendo la enfermedad remitente-recurrente, primaria progresiva y secundaria progresiva (RRMS, PPMS y SPMS, *del inglés respectivamente*)<sup>155</sup>. La mayor parte (85-90 %) de los pacientes con EM desarrollan la forma remitente-recurrente, que se caracteriza por períodos de exacerbación de los síntomas seguidos de su remisión<sup>161</sup>. A medida que la enfermedad avanza, la recuperación de los síntomas resulta incompleta y aproximadamente un 50% de estos pacientes desarrollan la forma secundaria progresiva, donde ocurre una acumulación progresiva e irreversible de discapacidad neurológica. Un número menor de pacientes con EM (10-15 %) presentan la forma primaria progresiva, donde los

síntomas progresan desde el inicio de la enfermedad <sup>161</sup>. La progresión de la enfermedad se caracteriza por la acumulación persistente de déficits neurológicos severos, junto con atrofia cerebral y deterioro neuronal. En la actualidad, las terapias modificadoras de la enfermedad se han centrado en reducir la actividad de la enfermedad, ralentizar su progresión y prevenir las recaídas al modular la respuesta inmune. Sin embargo, no logran detener por completo la progresión ni el proceso neurodegenerativo <sup>155</sup>. Por lo tanto, mejorar y racionalizar el tratamiento de la EM se presenta como una necesidad médica aún no satisfecha, donde resulta crucial obtener una comprensión más profunda de la fisiopatología junto con la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

Se cree que la Esclerosis Múltiple surge de una combinación de factores genéticos y ambientales. A nivel genético, se han encontrado más de 200 variantes genéticas vinculadas a la predisposición a la EM <sup>162</sup>. Dentro de ellas, la más fuerte se asoció a los alelos del complejo mayo de histocompatibilidad, siendo el alelo *HLA-DRB1* el de mayor riesgo <sup>163</sup>. Sin embargo, los factores genéticos por sí solos no explican la predisposición a desarrollar la enfermedad. Estudios realizados en gemelos monocigóticos mostraron que si uno de ellos presentaba EM, el otro tenía un riesgo del 25% de desarrollarla, mostrando que existen otros factores que explican el riesgo de presentar esta patología <sup>164</sup>. En este contexto, existiría un fuerte componente ambiental donde factores como la latitud, niveles bajos de vitamina D, obesidad, tabaquismo e infecciones influirían en la incidencia de la enfermedad <sup>165</sup>. Dentro de estos, la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV) tendría un rol primordial, puesto que el riesgo para desarrollar la enfermedad es mínimo en individuos no infectados y aumenta unas 30 veces luego de la infección con EBV <sup>166</sup>. Se estima que este fenómeno estaría dado por mimetismo molecular y respuestas inmunes alteradas frente a infecciones poco controladas por EBV <sup>166</sup>. En resumen, la EM resulta de una combinación entre la predisposición genética y factores ambientales. No obstante, independientemente de los factores desencadenantes, el eje central de la patología está dado por la respuesta inflamatoria que impulsa el daño tisular en el sistema nervioso central. A continuación, se analizará la

inmunopatología de la EM y los mecanismos que vinculan esta inflamación con el daño neurológico característico de la enfermedad.

## 5.2 Inmunopatología de la EM

La patología de la EM incluye la ruptura de la barrera hemato-encefálica (BHE), inflamación multifocal, desmielinización, pérdida de oligodendrocitos, gliosis reactiva y degeneración axonal <sup>167</sup>. La hipótesis más ampliamente aceptada para su comienzo implica la presencia de linfocitos T autorreactivos contra componentes del SNC, que escapan a los procesos de tolerancia inmune y se activan en la periferia <sup>160</sup>. Se estima que esta activación ocurriría por reactividad cruzada con antígenos ambientales – como EBV – o por el reconocimiento de antígenos solubles del SNC que filtran desde el líquido cefalorraquídeo (LCR) hacia los ganglios cervicales <sup>160,168</sup>. En cualquier caso, las células dendríticas presentan estos antígenos y promueven la activación y diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Los linfocitos T activados expresan moléculas de adhesión que les permiten interactuar con el endotelio y cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Además, secretan citoquinas proinflamatorias que aumentan la permeabilidad de la barrera y favorecen su ingreso al SNC. Dentro de estas interacciones, destaca la expresión de moléculas ICAM-1 y VCAM-1 en el endotelio que interactúan respectivamente con LFA-1 y VLA-4 en las células T <sup>160</sup>. De hecho, el bloqueo de VLA-4 con natalizumab previene el ingreso de los linfocitos al SNC y reduce la severidad de la enfermedad <sup>169</sup>.

Una vez dentro del SNC, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> interactúan con la microglía y las células dendríticas residentes, que actúan como presentadoras de antígenos del SNC, especialmente de proteínas de la mielina <sup>170</sup>. Estas interacciones promueven la reactivación de los linfocitos T autorreactivos, lo que amplifica la respuesta inflamatoria al facilitar el reclutamiento de más linfocitos T, monocitos y macrófagos hacia el sitio de inflamación <sup>156</sup>. Dentro de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, las células Th1 que producen IFN-γ y células Th17, productoras de IL-17 se encuentran en las lesiones activas de pacientes con EM y son necesarias para el desarrollo del

modelo murino de la enfermedad, la Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE)<sup>156</sup>. Las células Th17, en particular, adquirirían un perfil patogénico asociado con la secreción simultánea de IL-17 e IFN-γ que permite la activación de la microglía residente<sup>171</sup>. Además, este fenotipo patogénico secreta IL-21, IL-22 y TNF-α. Estas citoquinas regulan la activación de células B y la generación de células plasmáticas, aumentan la inflamación vía la activación de STAT3 (Del inglés: *Signal transducer and activator of transcription 3*) y contribuyen al proceso proinflamatorio respectivamente<sup>167</sup>. Asimismo, la IL-17 secretada por estas células promovería la ruptura de la BHE al inducir la producción de ROS en las células endoteliales<sup>172</sup>.

Por su parte, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos también desempeñan un rol crucial. Se ha observado que las células T CD8<sup>+</sup> son la población predominante en las lesiones cerebrales de pacientes con EM y correlacionan con la extensión del daño axonal<sup>173-175</sup>. Además, tanto las células T CD8<sup>+</sup> efectoras como las T CD8<sup>+</sup> de memoria efectora se han asociado con la enfermedad activa<sup>176-178</sup>. A su vez, las células T CD8<sup>+</sup> aisladas del SNC, LCR y sangre de pacientes con EM muestran evidencias de expansión oligoclonal, sugiriendo que fueron amplificadas en respuestas antígeno-dependientes<sup>179</sup>. La función citotóxica de estas células podría tener un rol central en el daño axonal, la muerte de oligodendrocitos y el daño neuronal. Finalmente, las células T CD8<sup>+</sup> encefalitogénicas también contribuirían a la patología al secretar IFN-γ e IL-17<sup>167</sup>. De manera interesante, algunos autores han sugerido que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreactivos podrían mostrar características de agotamiento en las encefalomielitis autoinmunes y otras enfermedades de la misma etiología, aunque el rol patogénico de este proceso ha sido poco explorado en la autoinmunidad<sup>103,104</sup>.

Además de los linfocitos T, las células B también contribuirían a la patología al producir autoanticuerpos. En acuerdo, el 90% de los pacientes con EM presenta bandas oligoclonales en el LCR, las cuales indican la presencia de anticuerpos IgM e IgG y constituyen uno de los elementos clave para el diagnóstico de la enfermedad<sup>180</sup>. A pesar de ello, la contribución de estos autoanticuerpos a la patología sigue siendo objeto de debate. Los linfocitos B, además de producir anticuerpos, podrían actuar en la EM al producir citoquinas/quimioquinas proinflamatorias y presentar

antígenos a los linfocitos T <sup>181</sup>. De hecho, se considera que la función de célula presentadora de antígeno (APC) de las células B media el mecanismo protector de las terapias de depleción de células B en la EM <sup>160</sup>.

A nivel de la inmunidad innata, monocitos, macrófagos y microglía tendrían un rol importante en la patogénesis de la EM. Se ha reportado que en pacientes con EM sin tratar hay un aumento de monocitos secretores de IL-6 e IL-12, y que los monocitos secretores de IL-12 correlacionan con la severidad de la enfermedad, acorde a la escala de EDSS (Del inglés: *Expanded Disability Status Scale*) <sup>182,183</sup>. Por su parte, se observa un número aumentado de macrófagos en las lesiones de pacientes con la forma RRMS, mientras que la presencia de la microglía se ha asociado con las fases más progresivas de la enfermedad <sup>184,185</sup>. Además, se ha detectado a la microglía en etapas tempranas en el cerebro de pacientes con EM, formando parte de “pre-lesiones activas” donde no se observan leucocitos infiltrantes ni desmielinización <sup>186</sup>. Tanto los macrófagos como la microglía tienen el potencial de mediar efectos protectores o daño tisular en la EM. Esta dualidad podría contribuir al perfil remitente-recurrente de la enfermedad y puede explicarse por su polarización a perfiles más proinflamatorios (M1) o resolutivos (M2) dependiendo del entorno citoquímico <sup>160</sup>. Durante las fases agudas, estas células tienden a adoptar un perfil M1, donde actúan como APCs y secretan citoquinas proinflamatorias (ej. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ) y moléculas neurotóxicas implicadas en la neurodegeneración (ROS, RNS). Sin embargo, en etapas de remisión predominaría el perfil M2, asociado a la fagocitosis de desechos celulares, secreción de citoquinas anti-inflamatorias (ej. IL-10, TGF- $\beta$ ) y factores neurotróficos que promueven la remielinización <sup>180</sup>. No obstante, este modelo dual es una simplificación de la realidad, puesto que macrófagos y microglía pueden adoptar una amplia gama de estados intermedios de activación <sup>187</sup>.

En este contexto, la microglía puede identificarse mediante marcadores fenotípicos como Iba1, TMEM119 y P2RY12, y su estado de activación puede evaluarse a través de la expresión de moléculas asociadas a perfiles proinflamatorios (CD86, MHC-II) o resolutivos (CD206, Arg1) según el entorno inflamatorio <sup>188</sup>. Al igual que otras células del compartimento mieloide, la microglía

es capaz de activar el inflamasoma NLRP3 que desempeña un rol en la inmunopatogenia de la EM. En la microglía, la activación del inflamasoma desempeña un papel en el inicio y la progresión de la EM, al reclutar células T activadas hacia el SNC y estimularlas para liberar citoquinas que agravan la respuesta inflamatoria<sup>189</sup>. De manera más general, variantes genéticas de ganancia de función del *NLRP3* y la *IL1B* se han asociado con la severidad y progresión de la EM<sup>77</sup>. En el modelo murino de EM, la EAE, la terapia con IFN-β controla la progresión al inhibir la activación del inflamasoma NLRP3<sup>190</sup>. Asimismo, en ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp-1*<sup>-/-</sup> y *Asc*<sup>-/-</sup>, se observa un inicio tardío y una menor gravedad de la EAE<sup>190,191</sup>. Por otra parte, la delección génica y el bloqueo farmacológico de los inflamasomas se han asociado con una disminución en la infiltración de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en el SNC<sup>192,193</sup>. De todos modos, los mecanismos precisos mediante los cuales la activación del inflamasoma modula estas poblaciones celulares aún no han sido completamente esclarecidos.

En suma, la esclerosis múltiple es una enfermedad con un fuerte componente autoinmune e inflamatorio, en la que confluyen mecanismos de la inmunidad innata y la adaptativa. Destacan la activación del inflamasoma NLRP3 en células mieloides y microglía, así como la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>. En ese sentido, identificar mecanismos y moléculas que regulen la actividad e interacción entre estos actores podría optimizar las terapias inmunomoduladoras existentes y desarrollar estrategias más eficientes para controlar la EM.

Entre los posibles mediadores, la Galectina-1 podría constituir un inmunorregulador relevante. Esta lectina se ha implicado en la modulación del inflamasoma, la microglía y los linfocitos T<sup>194-196</sup>. Además, su administración terapéutica mostró un efecto protector en el modelo de Encefalomielitis Autoinmune Experimental<sup>195,197</sup>. En el siguiente capítulo, se profundizará en la biología y el rol inmunomodulador de la Galectina-1.

## 6. Galectina-1: Un modulador clave de la inflamación aguda y crónica

La Galectina-1 es una proteína dimérica compuesta de dos sub-unidades de 14,5 kDa. Actúa como un mediador pro-resolutivo, inhibiendo respuestas inmunes innatas y adaptativas en diversos escenarios fisiopatológicos como el cáncer, la autoinmunidad, en distintos contextos infecciosos y en el trasplante de órganos<sup>198,199</sup>. Sus efectos inmunorreguladores son en general mediados por la lectina secretada, a través de interacciones del dominio de unión a carbohidratos (CRD) con residuos de *N*-acetyl-lactosamine (LacNAc) presentes en las ramificaciones de *N* u *O* glicanos<sup>14</sup>. Esos glicanos están presentes en receptores de superficie como CD45, CD43, CD69, pre-BCR y VEGFR2<sup>200-202</sup>. En el sistema inmune, la Galectina-1 es sintetizada y secretada por una variedad de células como linfocitos T y B activados<sup>203,204</sup>, DCs tolerogénicas<sup>205</sup>, microglía<sup>195</sup>, células mieloides supresoras<sup>206</sup>, entre otras. A nivel intracelular, la Galectina-1 lleva adelante sus funciones principalmente a través de interacciones proteína-proteína, de manera independiente de su CRD<sup>207,208</sup>.

En relación con los mecanismos celulares innatos, Galectina-1 es capaz de modular neutrófilos y macrófagos. En particular, inhibe la activación, quimiotaxis y extravasación de neutrófilos inducidas por estímulos proinflamatorios<sup>209,210</sup>. Además, Galectina-1 promueve un fenotipo anti-inflamatorio y pro-resolutivo de macrófagos al favorecer el metabolismo de la arginina por la vía de la arginasa y favorecer la diferenciación hacia M2<sup>211</sup>. Esta lectina también tiene un impacto en las células dendríticas al promover su diferenciación hacia un fenotipo tolerogénico, con secreción de IL-10 e IL-27<sup>205</sup>. Asimismo, Galectina-1 inhibe la migración de células dendríticas inmunogénicas, pero no tolerogénicas, a través de mecanismos que implican la glicosilación diferencial de CD43<sup>212</sup>. Además, en el SNC puede ser secretada por astrocitos e inhibe la activación de la microglía hacia fenotipos proinflamatorios (M1)<sup>195</sup>. A nivel de la inmunidad adaptativa, Galectina-1 tiene un rol diferencial en las poblaciones de linfocitos T. Por un lado, promueve la apoptosis de células Th1 y Th17, mientras que las células Th2 muestran resistencia

a este efecto debido a una alta sialilación de sus glicoproteínas de superficie <sup>196</sup>. Gal-1 también potencia la función de las células T reguladoras (Tregs), aumentando su capacidad inmunosupresora <sup>14,213</sup>. Finalmente, en los linfocitos B regula la diferenciación de células B activadas hacia células plasmáticas o de memoria <sup>214,215</sup>.

En contextos de inflamación aguda, Galectina-1 es capaz de inhibir la inflamación inducida por la administración de fosfolipasa A2 o carragenina y atenuar la infiltración de neutrófilos <sup>209,216-218</sup>. Además, la galectina-1 ha demostrado tener un rol inmunorregulador en distintos modelos experimentales de autoinmunidad como la artritis inducida por colágeno, la uveítis autoinmune experimental, la colitis inducida por ácido trinitrobenceno sulfónico y la EAE <sup>196,218-220</sup>. En la EAE, la administración de Gal-1 recombinante mejora la enfermedad al modular la activación de la microglía, la apoptosis de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Th1 y Th17) y al promover la diferenciación de DCs tolerogénicas <sup>195,196,205</sup>.

Por otro lado, la Galectina-1 tendría un rol pro-tumoral. En muestras de pacientes con melanoma y modelos experimentales de este cáncer en ratón, se observó que Galectina-1 podría actuar como un mediador del escape tumoral <sup>221</sup>. En acuerdo, la disruptión de los ligandos de Galectina-1 ralentizó el crecimiento tumoral y favoreció la inmunidad antitumoral <sup>222</sup>. En suma, la interacción de Galectina-1 con sus ligando fue reportado como un mecanismo de inmuno-evasión en un amplio número de modelos tumorales como pulmón, mama, páncreas, carcinoma de ovario, así como glioblastoma, neuroblastoma y linfoma de células T <sup>14</sup>.

Recientemente, Huang et al. mostraron que Galectina-1 inhibe al inflamasoma NLRP3 en un modelo de injuria pulmonar aguda <sup>223</sup>. Sin embargo, los mecanismos moleculares que median este efecto no han sido elucidados. En este contexto, Galectina-1 podría estar inhibiendo al inflamasoma NLRP3 a través de mecanismos iónicos. De hecho, la Galectina-1 es capaz de disminuir los niveles citosólicos de Ca<sup>2+</sup> <sup>224</sup>, aspecto clave en la activación de este complejo macromolecular <sup>23,45</sup>. De manera interesante, esta modulación del Ca<sup>2+</sup> implicaría la interacción directa de Galectina-1 con canales Ca<sub>v</sub>1.2 de tipo L <sup>224</sup>. Nuestro

equipo de trabajo se ha centrado en caracterizar el canal iónico TMEM176B como un inmunorregulador emergente, y demostró que este es capaz de inhibir el inflamasoma NLRP3<sup>52,225</sup>. La habilidad de la Galectina-1 para modular canales iónicos<sup>224</sup> e inhibir el inflamasoma<sup>223</sup> nos llevó a plantear que podría compartir un mecanismo inmunorregulador común con TMEM176B. Apoyando esta hipótesis, estudios de espectrometría de masas en células A549, una línea derivada de adenocarcinoma pulmonar, identificaron a Galectina-1 entre las proteínas que interactuaron con TMEM176B<sup>226</sup>. En el siguiente capítulo, profundizaremos en la biología de TMEM176B, su rol inmunomodulador y potencial como blanco terapéutico.

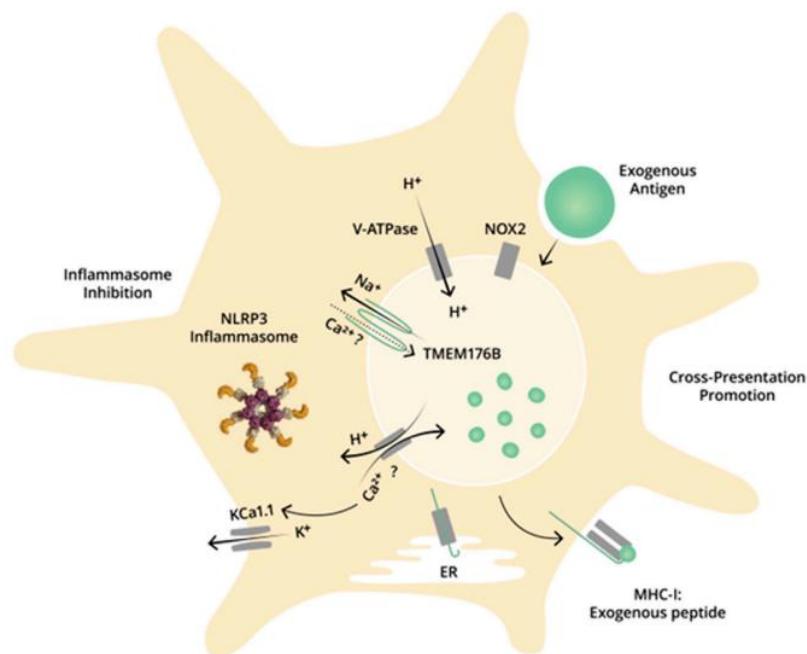
## 7. Tmem176b: un inmunorregulador emergente

En el espíritu de identificar nuevos mecanismos inmunorreguladores de la inflamación, nuestro grupo se ha centrado en la caracterización del canal iónico TMEM176B como un inmunorregulador emergente. A comienzos de los 2000, TMEM176B —también denominado TORID (*Tolerance Related and InduceD*)— fue inicialmente identificado por el equipo de la Dra. Cristina Cuturi como una molécula asociada a la tolerancia en el alotransplante<sup>227</sup>. Unos años más tarde, en este mismo contexto, se describieron mecanismos inmunorreguladores dependientes de TMEM176B<sup>228</sup>.

Esta es una proteína transmembrana intracelular, de expresión ubicua que pertenece a la familia de MS4A (Del inglés: “*Membrane-Spanning 4-domains Subfamily A*”)<sup>227-230</sup>. Además, posee un 30% de identidad con su proteína homóloga TMEM176A que también pertenece a la familia MS4A<sup>227,231</sup>. A nivel celular, ambas se localizan en la membrana endofagosomal y en la red trans-golgi<sup>227,228</sup> y se estima que ambas proteínas interactúan físicamente formando multímeros<sup>231,232</sup>. En el organismo, su expresión es prominente en órganos linfoideos, colon, pulmón e hígado<sup>231</sup>. En el sistema inmune, TMEM176B es fuertemente expresado por células del compartimento mieloide incluyendo monocitos, macrófagos y células dendríticas, así como por la microglía<sup>227,231,233,234</sup>. De manera interesante, la expresión de TMEM176B ha sido asociada al estado inmaduro de los monocitos y las células dendríticas, disminuyendo notoriamente luego de la estimulación inflamatoria<sup>235</sup>. Además, se ha descrito la expresión de TMEM176B por células ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> como ILC3, Th17 y células T  $\gamma\delta$ <sup>235</sup>. Sorprendentemente, TMEM176B fue identificado como uno de los pocos genes dependientes de ROR $\gamma$ T en células Th17, sugiriendo que esta proteína podría jugar un papel clave en la diferenciación y/o polarización de estos linfocitos<sup>236</sup>.

Nuestro grupo describió por primera vez la función molecular de TMEM176B como un canal de cationes no selectivo<sup>225,228</sup>. En estudios electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus*, se demostró que la sobre-expresión de TMEM176B se asoció

a una corriente de cationes monovalentes activada por ácido<sup>228</sup>. En DCs, TMEM176B regula el pasaje fagosomal de cationes monovalentes lo que impacta directamente en la actividad V-ATPasa y de esa manera en el pH endo-fagosomal<sup>228</sup> como se ilustra en la Figura 3. Este fenómeno promueve a su vez la presentación de antígenos exógenos en moléculas del MHC clase I (vía de la presentación cruzada) en células dendríticas<sup>228</sup>. Por otra parte, Lancien et. al. reportaron que TMEM176B y su homólogo TMEM176A también serían necesarios para la presentación de antígenos en moléculas del MHC clase II y la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup><sup>237</sup>.



**Figura 3. Rol dual de TMEM176B en células dendríticas: promoción de la presentación cruzada de antígenos e inhibición de la activación del inflamasoma.**

TMEM176B se localiza en la membrana endofagosomal y podría exportar  $\text{Na}^+$  desde el lumen endofagosomal hacia el citosol. Esta conductancia alivianaría el gradiente electroquímico para la V-ATPasa, promoviendo el bombeo de  $\text{H}^+$  hacia el lumen. Un pH neutro en el lumen endofagosomal en las DCs es crítico para procesar antígenos a través de la vía de presentación cruzada. En consecuencia, la eliminación de Tmem176b está asociada con una actividad disminuida de la V-ATPasa, un pH fagosomal alcalinizado y una presentación cruzada de antígenos deteriorada. Además, TMEM176B inhibe la activación del inflamasoma NLRP3 mediante mecanismos iónicos. La eliminación de Tmem176b está asociada con la activación del inflamasoma dependiente de KCa1.1. TMEM176B controla los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, aunque los mecanismos de este efecto permanecen desconocidos. Es posible que el  $\text{Ca}^{2+}$  sea internalizado a través de TMEM176B hacia el lumen fagosómico y/o que la actividad de TMEM176B promueva el intercambio  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ , promoviendo una disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

Extraído de Hill et. al., *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022.

Este control de la homeostasis iónica, además de modular el pH endofagosomal, influye sobre la activación del inflamasoma. En ese sentido, nuestro grupo de trabajo caracterizó a TMEM176B como un inhibidor del inflamasoma NLRP3 a través de mecanismos iónicos <sup>52</sup>. La delección de este gen se asoció a un aumento en la secreción de IL1-β e IL-18 en células dendríticas murinas cuando se estimuló al inflamasoma NLRP3 *in vitro*, en forma dependiente de la Caspasa-1. Esta observación se realizó con diferentes estímulos como ATP, nigericina y partículas de aluminio <sup>52</sup>. Por otra parte, su sobre-expresión en macrófagos humanos inhibió al inflamasoma NLRP3. *In vivo*, la delección de *Tmem176b* se asoció a un reclutamiento aumentado de neutrófilos luego de la inyección intraperitoneal (i.p.) de ATP, de manera dependiente de Caspasa-1 <sup>52</sup>. Desde un punto de vista mecanístico, las células dendríticas *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mostraron niveles superiores de Ca<sup>2+</sup> en comparación con células *wild-type* (WT) <sup>52</sup>. En acuerdo, la secreción de IL-1β por parte de DCs *Tmem176b*<sup>-/-</sup> depende del Ca<sup>2+</sup> citosólico y del eflujo de K<sup>+</sup> y en particular de la activación de canales de K<sup>+</sup> operados por Ca<sup>2+</sup> (KCa) como se ilustra en la figura 3. Dentro de estos, los canales KCa1.1 y KCa3.1 jugarían un rol importante en la activación del inflamasoma NLRP3 <sup>51</sup>. De manera interesante, TMEM176B pudo ser modulado farmacológicamente con el compuesto BayK8644 que fue patentado como su inhibidor <sup>52,238</sup>. Además, logramos encapsular a este compuesto en nanopartículas liposolubles de liberación lenta <sup>239,240</sup>. Esta última estrategia permitió una inhibición selectiva de TMEM176B, que promovió la activación del inflamasoma sin afectar la presentación cruzada de antígenos <sup>239</sup>.

En cuanto a la relevancia fisiopatológica, la alta expresión de TMEM176B en tumores se asoció con una sobrevida global reducida en pacientes con cáncer de colon, pulmón, gástrico y glioblastoma<sup>52,241,242</sup>. En modelos de cáncer de mama triple-negativo la expresión de TMEM176B se vinculó con la proliferación y migración celular, así como con la progresión del tumor en forma dependiente de la vía de señalización de AKT/mTOR <sup>243</sup>. Por su parte, Sun et. al. reportaron que en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar, TMEM176B promovió la transición epitelio-mesenquimal a través de la vía de JNK/FGFR <sup>226</sup>. En acuerdo, nuestro grupo

reportó que la delección génica y el bloqueo farmacológico *in vivo* de Tmem176b se asoció con un control del crecimiento tumoral a través de mecanismos que implican la activación de inflamasomas y respuestas antígeno-específicas mediadas por linfocitos T CD8<sup>+</sup><sup>52</sup>. Además, en esas condiciones también se observó un aumento de células Th17 anti-tumorales<sup>52</sup>. Desde un punto de vista terapeútico, la inhibición de Tmem176b sensibilizó la respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1 y anti-CTLA4 en modelos experimentales de melanoma, linfoma, cáncer colorrectal y de pulmón<sup>52</sup>. Estas evidencias nos llevaron a pensar que TMEM176B podría conformar un punto de control inmunológico. De ser así, su inhibición farmacológica podría ser beneficiosa en contextos donde la inflamación es deseable, pero perjudicial en escenarios en los que cumple un rol patogénico. En concordancia, diversas líneas de evidencia sugieren que TMEM176B actúa como un factor protector en escenarios fisiopatológicos donde la inflamación y la respuesta inmune contribuye al daño tisular. En ese sentido, nuestro grupo reportó recientemente que la modulación farmacológica de Tmem176b promovió la sobrevida de aloinjertos de piel y corazón<sup>244</sup>.

Por otro lado, un estudio de aleatorización mendeliana reveló que la expresión de TMEM176B presentó un patrón diferencial de expresión en las células de sangre periférica de pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, por sus siglas en inglés: *Acute Respiratory Distress Syndrome*) de etiología múltiple, en comparación con controles sanos<sup>245</sup>. En acuerdo, su expresión en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) se vio disminuida al comparar pacientes con neumonía por COVID-19 con aquellos sin neumonía<sup>246</sup>. Además, en modelos murinos de fibrosis pulmonar, Tmem176b mostró un rol protector al inhibir la vía de TGF-β1-SMAD<sup>247</sup>.

En el contexto de la autoinmunidad, la expresión de TMEM176B en sangre periférica ha sido asociada con las respuestas clínicas a la terapia anti-TNFα en artritis reumatoide<sup>248</sup>. Además, TMEM176B y TMEM176A se vieron aumentadas en monocitos de pacientes con síndrome de Sjögren en comparación con controles sanos<sup>249</sup>. En la Esclerosis Múltiple, TMEM176B y TMEM176A fueron descritos como parte de una firma molecular en PBMCs<sup>250,251</sup>. De manera interesante, la variante

genética A134T (rs2072443) de TMEM176B podría estar asociada con la esclerosis múltiple, aunque esto no ha sido probado formalmente <sup>250</sup>. Además, esta variante genética se ha vinculado con un pronóstico favorable en cáncer colorrectal sugiriendo una posible pérdida de función <sup>252</sup>. En el caso específico de la EM, TMEM176B también podría estar asociado a la respuesta a la terapia inmunomoduladora. En un estudio realizado por Comabella et al., se clasificaron a 47 pacientes con EM como respondedores y no respondedores a la terapia con IFN- $\beta$ . El estudio transcriptómico de sus PBMCs reveló que en los pacientes respondedores 43 genes fueron regulados a la baja, mientras que solo 3 genes fueron sobre-expresados, siendo TMEM176B uno de ellos <sup>253</sup>. En el modelo murino de EAE la evidencia sobre el rol de *Tmem176b* es aún limitada, existiendo un estudio de Drujont et al. que no reportó diferencias clínicas entre animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> <sup>235</sup>. Si bien estas observaciones contrastan con lo reportado en humanos, podrían depender del modelo utilizado o estar condicionadas por factores genéticos y ambientales como el sexo y la microbiota que son capaces de modular el curso y la severidad de la EAE <sup>254-258</sup>.

TMEM176B surge entonces como un inmunorregulador con funciones duales: por un lado inhibe respuestas efectoras anti-tumorales y por otro, podría ejercer un rol protector en enfermedades donde la inflamación contribuye a la severidad del cuadro clínico <sup>225</sup>. Este último punto aún no ha sido demostrado directamente y será abordado en este trabajo. Para ello, nos centraremos en dos contextos fisiopatológicos: la infección por SARS-CoV-2 y la Esclerosis Múltiple. Estos dos escenarios, aunque diferentes, cobran especial relevancia puesto que la expresión de TMEM176B, junto con la activación del inflamasoma, ha sido asociada a ambos estados fisiopatológicos <sup>72,156,246,250,251,253</sup>. Sin embargo, su papel funcional y/o una relación de causalidad con la patología no ha sido demostrada.

## Hipótesis

El estado de la literatura y los antecedentes de nuestro grupo de investigación nos llevaron a hipotetizar que TMEM176B podría conformar un punto de control inmunológico. En este sentido, la actividad de TMEM176B resultaría perjudicial en escenarios donde la inflamación es deseable y beneficiosa cuando la respuesta inflamatoria media la patogénesis. A partir del conocimiento generado en trasplante y cáncer, nos preguntamos si TMEM176B podría tener un rol protector en enfermedades inflamatorias, donde fuese deseable inhibir – y no activar – al inflamasoma. De la literatura surgía que la inflamación y la vía del inflamasoma NLRP3, tendrían un rol patogénico en la enfermedad grave por SARS-CoV-2<sup>72,144,259</sup>. En este contexto, especulamos que la infección por coronavirus podría ser un escenario donde la inhibición del inflamasoma por TMEM176B juegue un papel protector. Asimismo, si este canal iónico actuara como un punto de control inmunológico, su delección génica debería llevar a algún tipo de manifestación autoinmune. La evidencia de la literatura<sup>250,251,253</sup> nos llevó a especular que TMEM176B también podría tener una función inmunorreguladora en la Esclerosis Múltiple. Hipotetizamos entonces que TMEM176B podría tener un rol protector en estos contextos inflamatorios, mediado por la modulación del inflamasoma NLRP3, las poblaciones mieloides y los linfocitos T. Finalmente, distintas evidencias de la literatura nos llevaron a especular que la lectina inmunorreguladora Galectina-1 podría participar en un programa inmunorregulador común en la inhibición del inflamasoma NLRP3 junto a TMEM176B. Además, hipotetizamos que Galectina-1 podría modular la actividad de TMEM176B. En ese contexto, si TMEM176B resultara un blanco protector en patologías inflamatorias, la administración de Galectina-1 podría emplearse como estrategia terapéutica al regular la actividad de este canal iónico.

# Objetivos

## Objetivo general

Estudiar la función inmunorreguladora de TMEM176B en patologías inflamatorias donde la activación del inflamasoma se ha vinculado con la severidad de la enfermedad.

### *Objetivo específico 1*

Investigar el papel del canal catiónico TMEM176B en la regulación de la inflamación en el contexto de infecciones severas por  $\beta$ -coronavirus, incluyendo SARS-CoV-2 y su modelo murino MHV-A59.

### *Objetivo específico 2*

Investigar el rol protector de TMEM176B en la autoinmunidad, utilizando el modelo murino de EAE y explorar su interacción funcional con la lectina inmunorreguladora Galectina-1 para evaluar su potencial terapéutico.

# Materiales y métodos

## 1. Pacientes y donantes sanos

Todos los pacientes incluidos presentaron una prueba positiva de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para SARS-CoV-2. Estos fueron incluidos de acuerdo con el Comité de Ética Institucional de CASMU y Sanatorio Americano (IPM-COVID19-001) y con los principios de la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado de pacientes y donantes sanos (HDs) luego de explicar la naturaleza y posibles consecuencias de los estudios. Los HDs presentaron una prueba PCR negativa para SARS-CoV-2 y no tuvieron anticuerpos detectables contra SARS-CoV-2. Ni los pacientes ni los donantes fueron vacunados contra SARS-CoV-2. Los datos clínicos, antecedentes médicos y parámetros de laboratorio fueron obtenidos a partir de las historias clínicas electrónicas institucionales, respetando la confidencialidad de la información. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-paque (GE17-5446-02, Merck). Las células CD14<sup>+</sup> fueron enriquecidas utilizando un kit de selección positiva para CD14 humano de *Miltenyi*. El enriquecimiento obtenido fue típicamente superior al 80 %.

Para el aislamiento de PBMCs también se utilizó la fracción leuco-plaquetaria (En inglés “Buffy Coats”) provenientes de muestras de sangre del Centro de Hematología y Hemoterapia de la Unicamp (SP-Campinas, Brasil). Las muestras fueron diluidas (1:1) con PBS y 25 mL de esta mezcla fueron transferidos cuidadosamente a un tubo de 50 mL que contenía 7,5 mL de Ficoll. Los tubos se centrifugaron a 2700 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente sin freno. El anillo de PBMCs fue recolectado con pipeta, transferido a un nuevo tubo de 50 mL y lavado con PBS. El pellet se sometió a lisis de glóbulos rojos durante 5 minutos y se lavó nuevamente con PBS. Las PBMC totales se cultivaron como monocapas adherentes ( $1,5 \times 10^6$  células/mL) en medio RPMI 1640 suplementado con 1 % de penicilina-estreptomicina. Tras 2 a 3 horas de adhesión, las células fueron lavadas con PBS e incubadas hasta el momento de la infección en medio RPMI 1640 con

10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de penicilina-estreptomicina, a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Este estudio fue aprobado por el Comité Brasileño de Ética en Investigación con Seres Humanos (CAEE 31622420.0.0000.5404). El índice de comorbilidad de Charlson se calculó utilizando la herramienta disponible en [www.mdcalc.com/charlson-comorbidity-index-cci](http://www.mdcalc.com/charlson-comorbidity-index-cci). El puntaje de progresión clínica de la Organización Mundial de la Salud (WHO-CPS) se aplicó según lo reportado por el Grupo de Trabajo de la OMS para la Caracterización Clínica y Manejo de la infección por COVID-19<sup>260</sup>.

## 2. Animales

Los experimentos con ratones siguieron las normas ARRIVE (<https://arriveguidelines.org/>). Se emplearon ratones C57BL/6, machos ó hembras de 6-10 semanas de edad para el cultivo primario de BMDCs. En la inducción de encefalomielitis autoinmune experimental todos los ratones fueron hembras entre 9-13 semanas de edad, mientras que en la infección por MHV-A59 se emplearon machos de 8-10 semanas de edad. Todos los experimentos se realizaron acorde a la legislación local y aprobada por el Comité de Ética en experimentación animal. Las cepas *Tmem176b* <sup>-/-</sup>, *Tmem176b* <sup>+/+</sup> WT (Wild-Type) y *Tmem176b* <sup>-/-</sup> *Casp-1* <sup>-/-</sup> fueron criadas en la Unidad de Biotecnología de Animales de Laboratorio (UBAL) del Instituto Pasteur de Montevideo en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) o en el bioriterio convencional. Los animales infectados se mantuvieron en aisladores hasta el final del experimento. Los ratones *Lgals1* <sup>-/-</sup> ó *Lgals1* <sup>+/+</sup> (Wild-Type) fueron criados en el bioriterio del IBYME (CONICET).

## 3. Virus

El virus MHV-A59 fue gentilmente proporcionado por L. Retegui (UBA-CONICET, Argentina). Los virus MHV-A59 se expandieron en células murinas L929 hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de placa (PFU)/ml. Los sobrenadantes que contenían el virus se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

El virus SARS-CoV-2 HIAE-02/SP02/human/2020/BRA (número de acceso GenBank MT126808.1) fue aislado del segundo caso confirmado en Brasil y donado por E. L. Durigon. Los stocks del virus SARS-CoV-2 se propagaron en la línea celular Vero, y

el sobrenadante se recolectó a los 2 a 3 días postinfección (dpi). Los títulos virales se determinaron mediante ensayos de placas en células Vero. Las células Vero se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (SFB) y 1% de penicilina-estreptomicina, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4. Células**

Las BMDCs se generaron a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 machos y hembras. Las células de médula ósea de animales WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Casp1*<sup>-/-</sup> se cultivaron durante 8 días en presencia de dosis bajas de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (0,4 ng/ml). Al día 8, se recolectaron las células adherentes y se utilizaron en experimentos *in vitro*. En la infección por MHV-A59 se usaron diferentes multiplicidades de infección (MOI). Las BMDCs presentaron una expresión del 95% para CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> y un 50-70% de MHC II<sup>+</sup>. Las líneas celulares de monocitos humanos THP-1 (TIB-202), L929 (CCL-21), Vero (CCL-81) y de hámster chino CHO-K1 (CCL-61) fueron adquiridas de ATCC (Manassas, VA).

#### **5. Modelo murino de infección con MHV-A59**

Ratones macho de 8 a 10 semanas de edad fueron infectados por vía intraperitoneal con 800 pfu de MHV-A59 diluidos en 100 µL de PBS estéril en el día 0. En los experimentos de neutralización, los animales fueron tratados con anticuerpo anti-IL-1β (#AF-401-NA, *R&D Systems*, 1 µg cada 5 días desde el día -2) o con su correspondiente anticuerpo control IgG (#AB-108-C, *R&D Systems*). También se utilizó el anticuerpo anti-PD-1 (#BP0146, *Bio X Cell*, 200 µg por vía intraperitoneal cada 3 días) junto a su control IgG2a de rata (#BP0089, *Bio X Cell*). En los experimentos de depleción, los ratones recibieron anticuerpo anti-CD8a (#BE0117, *Bio X Cell*) a una dosis de 100 µg por vía intraperitoneal cada 3 días, a partir del día -2. Los animales fueron monitoreados de manera diaria y eutanasiados por dislocación cervical en los días indicados para la obtención de las muestras. La carga viral en el hígado se evaluó en el día 5 post-infección mediante RT-qPCR.

## 6. Ensayo de citotoxicidad celular *in vivo* de linfocitos T

El ensayo se realizó como fue descrito previamente<sup>52</sup>. Se aislaron esplenocitos de ratones control (en inglés “naive”) y se tiñeron con DDAO (#C34553, *Invitrogen*). Las células diana cargadas con el péptido específico de MHV-A59 (RCQIFANI, S598-605) se marcaron con una concentración alta de DDAO (0,8 µM). Como control, se marcaron células que no fueron cargadas con el péptido con una concentración diez veces menor de DDAO (0,08 µM). Ambas poblaciones celulares se mezclaron en proporciones iguales y se transfirieron por vía intravenosa a ratones singénicos infectados con MHV-A59 cinco días antes. Cuatro horas después, se eutanasiaron los animales, se prepararon suspensiones celulares a partir del bazo y se analizaron por citometría de flujo para determinar las proporciones relativas de células transferidas. El porcentaje de lisis específica se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis específica} = (1 - [r_{\text{naive}} / r_{\text{infectado}}]) \times 100,$$

donde  $r = \% \text{ de células DDAO}_{\text{baja}} / \% \text{ de células DDAO}_{\text{alta}}$ .

## 7. Infección con SARS-CoV-2 y generación de medio condicionado

Se infectaron monocitos humanos con SARS-CoV-2 (MOI = 0,1) o se mantuvieron como control en medio libre de virus (en inglés “mock”) bajo agitación continua a 15 rpm durante 1 hora para favorecer la absorción viral. Tras la infección, las células se lavaron dos veces con PBS precalentado y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina y con isoquerцитina (ISQ, *Quercegen Pharmaceuticals LLC*) a concentraciones de 0,5 y 5 µM. Al final del cultivos se colectaron los monocitos para analizar la activación de Caspasa-1 por citometría de flujo y la carga viral por RT-qPCR. El medio condicionado se generó a partir de estos cultivos. Los sobrenadantes de cada condición se recolectaron y expusieron a luz ultravioleta durante 30 minutos para inactivar cualquier virus residual. Luego, se almacenaron a -80 °C hasta su uso en los experimentos con células T humanas o para la cuantificación de IL-1β por ELISA siguiendo las instrucciones del proveedor (#DY201, *R&D Systems*).

## 8. Obtención de linfocitos humanos y reacción linfocitaria mixta

Se utilizaron PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) aisladas de la fracción leuco-plaquetaria de muestras de sangre de donantes sanos. Se co-cultivaron  $5 \times 10^5$  células con  $0,5 \times 10^5$  células de otro paciente para inducir una reacción alogénica. Las células se incubaron con pembrolizumab (anti-PD-1) (20  $\mu\text{g/ml}$ ), su isotipo control de IgG o con diferentes medios condicionados provenientes de monocitos sin infectar, infectados con SARS-CoV-2 y en presencia/ausencia de isoqueracetina (ISQ, *Quercegen Pharmaceuticals LLC*) (5  $\mu\text{M}$ ). 72 horas más tarde las células se estimularon durante 4 horas con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, #P8139, *Sigma-Aldrich*) (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) y un ionóforo de calcio (0,5  $\mu\text{g/ml}$ , #A23187 *Sigma-Aldrich*) en presencia de brefeldina A (10  $\mu\text{g/ml}$ , #420601 *Biolegend*). Las células se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos de fondo cónico y se marcaron para evaluar la presencia de linfocitos T CD8 productores de IFN- $\gamma$ . La adquisición se realizó en citómetro FACSsymphony, Becton & Dickinson, San Diego, CA, EE. UU. y para el análisis se empleó el software FlowJo vX.

## 9. Estimulación *in vitro* de PBMCs con péptidos de SARS-CoV-2

Se sembraron dos millones de células por pocillo en microplacas de 96 pocillos de fondo en U, utilizando medio de cultivo RPMI complementado con 10% de suero autólogo. Se agregó anti-PD-L1 (pembrolizumab, *Roche*) o IgG1 humana control a una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$ . Veinticuatro horas después, se incubaron durante 6 horas 0,6 nmol de cada péptido proveniente de un pool de péptidos del SARS-CoV-2 correspondientes a las proteínas M, N, E y S de la cepa silvestre y de la proteína S de las variantes P1 y Omicron (*Miltenyi*). Se añadió brefeldina A (1  $\mu\text{g/ml}$ ) durante las últimas 4 horas de cultivo. La presencia de células T exhaustas, así como la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , se evaluaron mediante citometría de flujo. Las citoquinas en el sobrenadante de cultivo se determinaron empleando un kit multiplex (#740809, *Biolegend*).

## 10. Análisis de carga viral y expresión génica por RT-qPCR

### 10. 1 Evaluación de la carga viral de MHV-A59

Se aisló ARN total a partir de bazo e hígado de ratones utilizando el reactivo TRIzol (#15596026, *Invitrogen*), siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (*Thermofisher Scientific*). La transcripción reversa se realizó utilizando M-MLV Reverse Transcriptase (#28025013, *Invitrogen*) y primers aleatorios (#48190011, *Invitrogen*). La carga viral se analizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real utilizando Fast SYBR Green Master Mix (#4385616, *Applied Biosystems*) en el equipo Eco Real-Time PCR System (*Illumina*) o Applied Biosystems Quantsudio 3 (*Fischer Scientific*) según disponibilidad. Para detectar la carga viral de MHV-A59, se emplearon los siguientes primers:

GGAACCTCTCGTTGGCATTATACT (forward),

ACCACAAGATTATCATTTCACAACATA (reverse).

### 10. 2 Evaluación de la carga viral de SARS-CoV-2

El ARN total se extrajo y cuantificó como se describió previamente. La retrotranscripción se realizó con el kit GoScript Reverse Transcriptase cDNA Synthesis Kit (#A5001, *Promega*). La detección de la carga viral de SARS-CoV-2 se llevó a cabo mediante RT-qPCR utilizando SYBR Green Supermix (#1725271, *Bio-Rad*) en el sistema CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (*Bio-Rad*), con primers específicos de SARS-CoV-2 dirigidos a la región N1 del gen N<sup>261</sup>. Para la cuantificación absoluta se generó una curva estándar mediante diluciones seriadas del virus.

### 10. 3 Análisis de *Tmem176b* en tejidos de ratón o cultivos celulares

La extracción de ARN, cuantificación y retrotranscripción se realizó de igual manera que para cuantificar la carga viral de MHV-A59. La expresión génica se evaluó mediante qPCR con el reactivo Fast SYBR Green Master Mix (#4385616, *Applied Biosystems*) en el sistema Eco Real-Time PCR System (*Illumina*) o Applied Biosystems Quantsudio 3 (*Fischer Scientific*) según disponibilidad. La expresión de *Tmem176b/TMEM176B* se normalizó empleando *Gapdh* como gen de referencia y se analizó mediante el método 2<sup>-ΔΔCt</sup>. Para los experimentos en tejidos de ratón, se

utilizaron primers específicos diseñados para abarcar diferentes exones. Para *Tmem176b* se utilizaron los siguientes primers: ACTCCAGCTAGAATTGCCACAG (*forward*) y CATCAGCATCCACATCCACC (*reverse*). Para *Gapdh*, se emplearon los primers CTACAGCAACAGGGTGGTGG (*forward*) y TATGGGGTCTGGATGG (*reverse*). En el caso de los monocitos humanos THP-1 la expresión de *TMEM176B* se analizó utilizando los primers GCCATTGTCCATGAGAAGCA (*Forward*) y ATTGCTGTGAACAACTTCCTCAG (*Reverse*) y se normalizó contra *GAPDH* como control endógeno empleando los primers CCACATCGCTCAGACACCAT (*Forward*) y GGCAACAATATCCACTTACCACTAGAGT (*Reverse*).

## 11. Cuantificación de la activación del inflamasoma

La activación del inflamasoma se evaluó mediante diferentes abordajes. En muestras de pacientes y células humanas se cuantificaron los niveles de IL-1 $\beta$  y de caspasa-1 activa en sobrenadantes mediante ensayos ELISA comerciales (IL-1 $\beta$ : #557953, *BD Biosciences*; Caspasa-1: #DCA100, *R&D Systems*). En células de ratón, los niveles de IL-1 $\beta$  en sobrenadantes se determinaron también por ELISA (#432603, *Biolegend*). Además, en tejidos murinos se evaluaron los niveles de IL-1 $\beta$  y caspasa-1 activas por análisis de Western Blot como se describe en la sección 12. Complementariamente, en células humanas y murinas se midió la actividad de caspasa-1 mediante citometría de flujo utilizando el reactivo FLICA-660 Caspase-1 Assay (#9122, *ImmunoChemistry Technologies*). Todos los ensayos se emplearon acorde a las instrucciones del proveedor.

## 12. Análisis por Western blot

Los extractos hepáticos (50  $\mu$ g de proteína) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con SDS, y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*GE Life Sciences*). Después de la transferencia, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión de anticuerpos con una solución de albúmina sérica bovina al 3%, 30 mM de Tris, 0,14 M de NaCl y 0,1% (v/v) de Tween 20 (pH 8,0) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. La incubación con los anticuerpos específicos se realizó durante la noche a 4 °C (anti-IL-1 $\beta$ , clon H-153, #sc-7884, *Santa Cruz Biotechnology*; anti-caspasa-1, clon gasper-1, #AG-20B-

0042, *AdipoGen*). Los anticuerpos unidos se revelaron mediante anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa anti-ratón (#115-035-003, *Jackson ImmunoResearch*) o anti-conejo (#111-035-003, *Jackson ImmunoResearch*) y con el reactivo ECL de Pierce (*Thermo Fisher Scientific*). Los monocitos humanos CD14<sup>+</sup> se analizaron utilizando anti-TMEM176B (#ab103929, *Abcam*, anticuerpo políclonal de conejo) y revelaron con el anti-conejo mencionado anteriormente.

### **13. Activación del inflamasoma *in vitro***

El inflamasoma NLRP3 se estimuló *in vitro* en células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDCs) de ratones C57BL/6 *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y WT, ó *Lgals1*<sup>-/-</sup> y su control WT. Al día 8, las células adherentes presentaban un fenotipo mayoritariamente CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHC II<sup>int</sup> (>95%). Para activar el inflamasoma se colectó la fracción adherente de BMDCs y se despositaron 5x10<sup>4</sup> células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células fueron tratadas con LPS (0,25 µg/mL) (#L3491, *Sigma-Aldrich*) durante 3 horas. Seguidamente, se lavaron con PBS estéril y se agregó Nericina (2,5 µM ó 5 µM) (#N7143, *Sigma-Aldrich*) ó ATP (0,5-2 mM) (#10127531001, *Roche*) por 45 - 120 minutos. En algunos ensayos luego del tratamiento con LPS, se adicionó Galectina-1 recombinante a las concentraciones indicadas y se incubó durante 15 minutos antes de proceder al lavado y la estimulación con Nericina o ATP. De manera análoga, la neutralización de Galectina-1 se realizó 15 minutos previo al estímulo con Nericina ó ATP con un anti-Gal-1 (1,5 µM, Laboratorio de Glicomedicina – IBYME) o su anticuerpo control (1,5 µM #MPC-11, *Bioxcell*).

La activación del inflamasoma también se evaluó en BMDCs infectadas con el virus MHV-A59. En estos casos, las células fueron diferenciadas de la misma manera y luego infectadas durante 24 horas a las multiplicidades de infección indicadas, sin estímulos adicionales. De forma análoga, se estudió la activación del inflamasoma en monocitos CD14<sup>+</sup> primarios humanos, que fueron infectados durante 24 horas con SARS-CoV-2 (MOI 0,1).

En todos los casos, se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C para su análisis posterior de secreción de IL-1β mediante ELISA. Para la evaluación

de la activación de caspasa-1 o IL-1 $\beta$  por citometría de flujo o Western blot, las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^5$  células en placas Petri de 3 cm de diámetro y se estimularon bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, se recolectaron las células para su análisis.

El rol de la activación del inflamasoma también fue evaluado en células THP-1. Se diferenciaron macrófagos a partir de células THP-1 durante 48 horas en presencia de PMA (#P8139, *Sigma-Aldrich*) (100 nM). Una vez diferenciados, se depositaron  $5 \times 10^4$  células en placa de 96 y se trataron con LPS (0,25  $\mu$ g/mL) durante 3 horas. Seguidamente se lavaron con PBS estéril y fueron tratados con Galectina-1 (0,3  $\mu$ M) durante 15 minutos e inmediatamente se agregó Nigericina (2,5  $\mu$ M) incubándose durante 45 minutos en presencia o no del inhibidor de Tmem176b BayK8644 (50  $\mu$ M). Al finalizar, se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C.

#### **14. Transfección de células THP-1 y activación del inflamasoma**

La activación del inflamasoma también fue evaluada en monocitos THP-1 sin diferenciar. Las células fueron nucleofectadas con plásmidos pcDNA3.1 codificantes para la proteína E del SARS-CoV-2 fusionada a GFP, o con un plásmido control codificante solo para GFP, utilizando el kit Amaxa Cell Line Nucleofector V (#VCA-1003, *Lonza*) y el equipo Nucleofector 2b (*Amaxa*). En experimentos adicionales, se co-transfектaron las células con estos plásmidos y con el pmCherry-N1 (control), TMEM176B–pmCherry-N1 o TMEM176B\_A134T–pmCherry-N1. 16 horas post-transfección las células fueron tratadas durante 24 horas con LPS (0,25 ng/ $\mu$ L). En algunos de estos ensayos, cuatro horas después de la transfección, las células fueron tratadas con Galectina-1 (0,3  $\mu$ M), o con la combinación Galectina-1 (0,3  $\mu$ M) + BayK8644 (10  $\mu$ M), y mantenidas en cultivo durante 20 horas. Al finalizar este período se procedió a estimular con LPS como se describió previamente. Se colectaron los sobrenadantes para la cuantificación de IL-1 $\beta$  por ELISA, o las células para evaluar la activación de caspasa-1 mediante citometría de flujo utilizando la sonda FLICA-1.

Además, se realizó un ensayo independiente en el que células THP-1 fueron transfectadas con el plásmido control pmCherry-N1, TMEM176B–pmCherry-N1 o

con la variante TMEM176B\_A134T–pmCherry-N1. En este caso, las células fueron estimuladas con nigericina (2,5  $\mu$ M durante 15 minutos) para inducir la activación del inflamasoma. Posteriormente, se analizaron mediante citometría de flujo utilizando la sonda FLICA-1 para detectar caspasa-1 activa.

## 15. Activación del inflamasoma *in vivo*

Se inyectaron a animales C57BL/6 Lgals1<sup>+/+</sup> o Lgals1<sup>-/-</sup> por vía intraperitoneal con ATP a una dosis de 20 mg/kg. En los experimentos de neutralización se administraron 1 hora previo al tratamiento 200  $\mu$ g de un anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  (#AF-401-NA, *R&D Systems*) o su correspondiente anticuerpo control IgG (# AB-108-C, *R&D Systems*). Cuatro horas más tarde, se realizó un lavado peritoneal utilizando 5 ml de PBS. Las células recuperadas del lavado fueron centrifugadas y teñidas con anticuerpos anti-CD11b, anti-Ly6C y anti-Ly6G. Posteriormente, las células se analizaron por citometría de flujo en el citómetro BD LSRFortessa X-20. Se determinó el porcentaje de células Ly6C<sup>int</sup> Ly6G<sup>high</sup> dentro del compartimento de células CD11b<sup>+</sup> (neutrófilos). Para cada condición experimental, se calculó además el número absoluto de neutrófilos.

## 16. Ensayo de encefalomielitis autoinmune experimental

Ratones hembra C57BL/6 de 9-13 semanas de edad fueron inmunizados en forma subcutánea en los flancos izquierdo y derecho de la base de la cola del ratón, con 200  $\mu$ g de péptido MOG<sub>35-55</sub> (#LT12018, LT051716, *LifeTein*) emulsificado en 200  $\mu$ L de adyuvante completo de Freund (#231131, *BD Biosciences*) suplementado con 4 mg/mL de *Mycobacterium Tuberculosis* inactivado (#231141, *BD Biosciences*). El día de la inmunización y 48 horas más tarde, los ratones recibieron una inyección de 500 ng de toxina pertussis (#180, *List Biological Laboratories*) en 100  $\mu$ L de solución salina estéril. Se registró el peso y el score clínico de cada ratón en forma diaria. El score clínico se definió de la siguiente manera: 0-No hay síntomas de la enfermedad, 0,5 -Cola parcialmente paralizada, 1-Cola totalmente paralizada, 2- Debilidad ligera de las extremidades inferiores (reflejo rápido de enderezamiento), 3-Debilidad severa de las extremidades inferiores (reflejo lento de enderezamiento), 3,5-Debilidad severa de las extremidades inferiores acompañada por parálisis

parcial de una de las extremidades superiores 4- Parálisis total de las extremidades inferiores, 5-Parálisis total de las extremidades superiores, 6-Muerte. Al aparecer los primeros síntomas clínicos se incorporó la comida dentro de la caja y el agua se hizo más accesible. Cuando los animales llegaron al grado 3 se moniteró la vejiga por palpación y se mantuvieron hidratados con inyecciones diarias de 0,2 mL de solución salina estéril. Aquellos ratones que llegaron a grado 5 fueron inmediatamente eutanasiados por dislocación cervical.

El tratamiento con Galectina-1 se realizó entre los días 9 y 13 post-inmunización, mediante la administración intraperitoneal de 100 µg de Gal-1 recombinante disueltos en 100 µL de PBS estéril. Como control se administraron 100 µL de PBS estéril.

Los animales fueron sacrificados entre los días 8 y 21 post-inmunización bajo anestesia profunda con ketamina:xilacina (90:10 mg/kg, vía intraperitoneal). Para el análisis histológico, se realizó una perfusión intracardíaca con PFA al 4% y se extrajo la médula espinal. En los casos en que las muestras se destinaron a otros tipos de procesamiento, la perfusión se realizó con HBSS frío sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ .

## 17. Tinción por Inmunofluorescencia

### 17. 1 Hígado

Criocortes de hígado de ratón (20 µm) fueron fijados en acetona y se tiñeron empleando los buffers de bloqueo, anticuerpos primarios y secundarios como se indica en la tabla 1. El anticuerpo biotinilado fue revelado con estreptavidina-Alexa Fluor 568 (#S11226, *Invitrogen*). Las secciones se lavaron tres veces con PBS después de cada incubación. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (#D9542, *Sigma-Aldrich*). Como controles negativos, se incubaron las secciones de tejido con Inmunoglobulina G (IgG) del isotipo correspondiente o con PBS en lugar de los anticuerpos primarios (Tabla 1). Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal LSM 880 y el software de microscopía Zen blue (Zeiss).

**Tabla 1.** Condiciones y reactivos empleados para inmunofluorescencia en hígados.

Anticuerpos primarios	Proveedor	No Catálogo	Concentración	Buffer Bloqueo
Anti-TMEM176B	Proteintech	19825-1	10 µg/mL	PBS-BSA 4%, saponina 0,3 %, SNR 2%
Anti-MHC clase II	Serotec	MCA45R	5 µg/mL	PBS-BSA 4%, saponina 0,3 %, SNC 2%
Anticuerpos secundarios	Proveedor	No Catálogo	Concentración	
Alexa Fluor 488 anti-ratón IgG	Invitrogen	A-11029	3,3 µg/mL	
Anti-conejo biotinilado	Sigma-Aldrich	SAB3700936	4 µg/mL	

**SNR:** Suero normal de ratón (#M5905, Sigma-Aldrich), SNC: Suero normal de cabra (#S26-M, Sigma-Aldrich)

## 17.2 Médula espinal

Se utilizaron cortes de la región lumbar de la médula espinal de ratones previamente perfundidos y fijados con paraformaldehído al 4%, con un espesor de 20 µm. Los portaobjetos fueron aclimatados a temperatura ambiente durante 20 minutos para favorecer la adhesión del tejido. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS 1X o PBST 1% (PBS-Tritón 1%) según el protocolo correspondiente. El bloqueo se llevó a cabo en cámara húmeda durante 45 a 60 minutos utilizando el buffer adecuado según la tinción (Tabla 2). Se realizaron dos esquemas de tinción: Para la identificación de células Iba1<sup>+</sup>/TMEM176B<sup>+</sup>, se empleó un protocolo con PBS-BSA 4% – SNB 2% – saponina 0,3% como buffer de bloqueo, y amplificación de señal mediante anticuerpo biotinilado seguido de estreptavidina-FITC. Para la identificación de microglía activada (Iba1<sup>+</sup>/MHC II<sup>+</sup>), se utilizó un buffer de bloqueo compuesto por PBS-Tritón 1% – suero fetal bovino (SFB) 10%.

Las incubaciones con anticuerpos primarios se realizaron a 4 °C durante 24 horas en cámara húmeda, y las incubaciones con anticuerpos secundarios se llevaron a

cabo a temperatura ambiente durante una hora. Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI y las muestras se montaron con ProLong Gold (#P36930, *Sigma-Aldrich*) para su análisis. Las imágenes fueron adquiridas mediante el microscopio confocal Zeiss LSM 800. Se realizaron experimentos Z-stack de la médula de cada animal y se tomaron n=10 campos por ratón. Las imágenes fueron editadas en el software FIJI ImageJ donde se realizó el conteo de las células.

**Tabla 2.** Condiciones y reactivos empleados para inmunofluorescencia en hígados.

Anticuerpos primarios	Proveedor	No Catálogo	Concentración	Buffer de bloqueo
Anti-TMEM176B	Proteintech	19825-1	10 µg/mL	PBS-BSA 4%, saponina 0,1%
Anti-Iba1	Novus Biologicals	NB1001028	10 µg/mL	PBS-BSA 4%, SNB 2%, saponina 0,3%
Anti-Iba1	Wako	01919741	0,8 µg/mL	PBS-Tritón 1%, SFB 10%
Anti-MHC clase II	Bio-Rad	MCA45R	5 µg/mL	PBS-Tritón 1%, SFB 10%
Anticuerpos secundarios	Proveedor	No Catálogo	Concentración	Observaciones
Anti-conejo biotinilado (burro)	Sigma-Aldrich	SAB3700936	4 µg/mL	Amplificación señal TMEM176B
Esteptavidina-FITC	Invitrogen	11-4317-87	1,7 µg/mL	Revelado señal TMEM176B
Anti-cabra Alexa Fluor 555	Invitrogen	A21432	4 µg/mL	Revelado señal Iba1 (Novus)
Anti-conejo Alexa Fluor 488	Thermo Fisher	A11008	3,3 µg/mL	Revelado señal Iba1 (Wako)
Anti-ratón Alexa Fluor 546	Thermo Fisher	A11030	3,3 µg/mL	Revelado señal MHC II

**SNB:** Suero Normal de Burro (#S30, *Sigma-Aldrich*)

**SFB:** Suero Fetal Bovino (#12657, *Gibco*)

### 17. 3 Inmunofluorescencia en células CHO

Para estudiar la internalización de Galectina-1 y su relación con TMEM176B, células CHO fueron transfectadas con un plásmido codificante para TMEM176B fusionado a mCherry. A las 24 horas post-transfección, las células fueron tratadas con OVA conjugada a Alexa Fluor 647 (50 µg/mL) (#O34784, Invitrogen) y Galectina-1 biotinilada (20 µg/mL), incubándolas durante 20 minutos a 37 °C o a 0 °C. Luego, se realizaron lavados con PBS y se dejó incubar durante 10 minutos adicionales a temperatura ambiente para favorecer la internalización. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente incubadas con una solución de bloqueo y permeabilización (PBS con 4% de albúmina sérica bovina, 0,3% de Tritón X-100 y 2% de suero de ratón) durante 45 minutos. La detección de Galectina-1 se realizó mediante incubación con estreptavidina-DTAF (#PNIM0307, Beckman-Coulter) durante 1 hora, seguida de tinción nuclear con DAPI (5 minutos). Finalmente, las muestras fueron montadas con ProLong Gold (#P36930, Sigma-Aldrich) y se adquirieron imágenes mediante microscopía confocal en el equipo LSM 800 (Zeiss).

### 18. Determinación del Ca<sup>2+</sup> citosólico en células dendríticas

El Ca<sup>2+</sup> citosólico se determinó en células dendríticas derivadas de médula ósea, cultivadas acorde al protocolo expuesto anteriormente. Se sembraron 1x10<sup>6</sup> células por pocillo en placas de 8 pocillos (#80826, *Ibidi*) y se estimularon durante 2 horas con LPS (0,25 µg/mL). Luego, se cargaron con la sonda específica de Ca<sup>2+</sup> Fura-2 (#F1201, *Invitrogen*) (10 mM en medio HBSS-Ca<sup>2+</sup>) durante 30 minutos a 37°C. Luego, se lavó con PBS y se agregó medio fresco. Se registró la emisión 340/380 nm por microscopía de *time-lapse*. Se dejaron transcurrir 10 minutos con ó sin Galectina-1 (1 µM) y a t=0 se agregó el ATP (0,5 mM). Se calculó el % del área bajo la curva para el pico específico de Ca<sup>2+</sup> inducido por el ATP, con respecto a la condición control (sin Galectina-1).

### 19. Tinción con Luxol Fast Blue

Secciones lumbares de médula espinal (20 µm) fueron deshidratadas en soluciones de concentración creciente de etanol y luego incubadas durante 16

horas a 37 °C en una solución de Luxol Fast Blue (LFB) (#S3382, *Sigma-Aldrich*) preparada en etanol al 95 % con ácido acético al 0,05 %. Tras un lavado en agua destilada, se realizó la diferenciación en carbonato de litio al 0,05 % (#62470, *Sigma-Aldrich*) durante 2 minutos. Posteriormente, se realizaron lavados de 2 minutos con etanol al 95 % y 100 %, seguidos de xilol. Finalmente se realizó el montaje con DPX (#06522, *Sigma-Aldrich*) y los preparados se dejaron secar durante 24 horas. Las imágenes se adquirieron con un microscopio Nikon Eclipse E200 y se analizaron utilizando el software FIJI/ImageJ. Se empleó un macro escrito por el Dr. Bruno Pannunzio <sup>262</sup> que permitió segmentar la sustancia blanca y distinguir áreas mielinizadas y desmielinizadas mediante la definición de un umbral específico asociado a la tinción del LFB. Para la cuantificación se calculó el porcentaje de área desmielinizada y normalizó por el tamaño total de la médula espinal.

## **20. Análisis hematológicos**

Se recolectaron alícuotas de 20 µL de sangre mediante punción submandibular y se almacenaron en microtubos de 0,5 mL que contenían sales potásicas de EDTA (Anticoagulante W, Wiener Lab, Rosario, Argentina) en una proporción de 1:10 (EDTA:sangre). El análisis se realizó dentro de las cuatro horas posteriores a la extracción utilizando un autoanalizador hematológico BC-5000Vet (Mindray Medical International Ltd., Shenzhen, China). Se determinaron los recuentos diferenciales de leucocitos y se calculó el cociente neutrófilos / linfocitos.

## **21. Ensayo de co-precipitación Tmem176b/Galectina-1**

Células CHO fueron co-transfectadas con Tmem176a-mCherry y Tmem176b-V5, y se sorteó la población mCherry+ en el citómetro BD FACSaria Fusion. Las células fueron lisadas posteriormente y se incubó 1 µg del lisado celular a 4°C durante 16 hs con Galectina-1 biotinilada o una proteína biotinilada control en TBS-Tween 0,1% con ó sin NaCl 150 mM. En paralelo, se bloquearon 0,25 mg de Streptavidin Magnetic Beads (#88816, *Thermo Fisher Scientific*) en PBS-BSA 5% durante 16 hs a 4°C. Posteriormente, se incubó el lisado celular con Galectina-1 ó proteína control con las beads bloqueadas durante 30 minutos a temperatura ambiente en TBS-

Tween 0,1%. Se co-precipitó con un imán y se eluyó por incubación en buffer de carga de electroforesis SDS-PAGE durante 5 minutos a 100°C. Las muestras se corrieron en un gel de SDS-PAGE y visualizaron por Western Blot mediante el agregado de un anticuerpo- $\alpha$ -V5-HRP (#460708, Invitrogen).

## 22. Ensayo de actividad iónica de TMEM176B

Células CHO fueron transfectadas con los plásmidos pmCherry-N1 o *huTMEM176b-pmCherry-N1* utilizando Lipofectamina LTX con Plus Reagent (#15338100, *Invitrogen*) durante 4 horas, lavadas y cultivadas durante 24 horas. Luego, las células se cargaron con 1 mM de ANG-2 (*Asante NaTRIUM Green-2, #ab142802, Abcam*) durante 30 min a 37 °C, se lavaron y se incubaron durante 30 min en un tampón fosfato que contenía 140 mM de Na<sup>+</sup> o 140 mM de *N*-metil-D-glucamina (NMDG) para sustituir el Na<sup>+</sup>, en presencia de distintas dosis de los fármacos en estudio o sus vehículos control. Posteriormente, las células fueron analizadas por citometría de flujo en un citómetro BD Accuri C6 equipado con un láser de 488 nm. La emisión de ANG-2 se detectó con un filtro de paso de banda de 530/30 nm y la fluorescencia de mCherry se determinó con un filtro de paso largo de 670 nm. El análisis de datos se realizó con el software FlowJo vX.0.7. El MFI de las soluciones que contenían NMDG se restó al MFI de las soluciones con Na<sup>+</sup>.

En los experimentos destinados a estudiar múltiples condiciones de transfección y/o tratamiento, se utilizó un ensayo en placas de 96 pocillos para medir la fluorescencia de la sonda ANG-2 mediante el equipo Varioskan LUX (*Thermo Fisher Scientific*). Este enfoque permite una medición rápida e integrada de la fluorescencia asociada al sodio citosólico en respuesta al tratamiento, minimizando variaciones derivadas del decaimiento progresivo de la sonda en el tiempo. Las células CHO fueron transfectadas con los plásmidos p-mCherry-N1, p-TMEM176B-mCherry-N1 o p-TMEM176B\_A134T-mCherry-N1, según se describió previamente. A las 24 horas, se verificó que los porcentajes de transfección fueran comparables entre condiciones, y se sembraron 100.000 células por pocillo en placa de 96. Posteriormente, las células se marcaron con la sonda ANG-2, como fue descripto, y se incubaron en presencia o ausencia de Galectina-1, en un tampón fosfato que contenía Na<sup>+</sup> (140 mM) o NMDG (140 mM) como sustituto. La

fluorescencia se registró a 37 °C durante 100 minutos, con lecturas cada 1 minuto, utilizando una excitación de 525 nm y una emisión recolectada a 545 nm. La fluorescencia registrada para las soluciones con NMDG se restó a la de las soluciones con Na<sup>+</sup> y se calculó el área bajo la curva de intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo.

## **23. Procesamiento de órganos murinos y adquisición por citometría de flujo**

Para el análisis por citometría de flujo se obtuvieron diferentes tejidos según el modelo experimental. En ratones con encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), se realizó perfusión con HBSS 1X antes de la extracción de la médula espinal (mediante técnica de *flush-out*) y de los ganglios linfáticos inguinales. En el modelo de infección con MHV-A59 no se realizó perfusión previa, y se extrajeron el hígado y el bazo. Las muestras de médula espinal se digirieron durante 15 minutos a 37 °C con agitación en una solución que contenía colagenasa D (1 mg/mL, #11088858001, Roche) y DNasa I (100 U/mL, #D4527, Sigma-Aldrich). Todos los órganos se disgregaron mecánicamente pasando el tejido a través de un filtro de nylon de 70 µm. Las suspensiones celulares de ganglios e hígados se contaron y se ajustaron a un volumen final de 1 mL en PSA (PBS-SFB 0.2% - Azida de sodio 0.1%). Las células provenientes del bazo se sometieron a lisis de glóbulos rojos, se lavaron con PSA y se ajustaron a un volumen final de 1 mL. Las células de médula espinal se purificaron mediante un gradiente de Percoll al 30% (8 mL) seguido de centrifugación a 850 g sin freno, para eliminar la mielina. Posteriormente, se lavaron con PSA y se cuantificaron. En los experimentos donde se evaluó la producción de citoquinas se evitó el uso de azida de sodio durante el procesamiento de los tejidos. En estos casos, las células se estimularon durante 3 horas en presencia de PMA (50 ng/mL, #P8139, Sigma-Aldrich), ionomicina (1 µg/mL, I0634, Sigma-Aldrich) y brefeldina A (5 µg/mL, #420601, *Biolegend*).

La tinción con marcadores de viabilidad fijables se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la detección de caspasa-1 activa, se utilizó el reactivo FLICA-1 (1:100, 20 µL/muestra) durante 30 minutos a 37 °C en PBS 1X. El marcado

con tetrámeros de MHV-A59 y MOG se realizó a una dilución 1:200 durante 20 minutos a temperatura ambiente. El marcado de antígenos de superficie se realizó en hielo durante 20 minutos (20  $\mu$ L/muestra) en PSA. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2% durante 10 minutos en hielo y se lavaron antes de su adquisición en el citómetro. En los casos en que se realizó tinción intracelular, las células se permeabilizaron post-fijación con 50  $\mu$ L de saponina al 0,5% (#84510, *Sigma-Aldrich*) diluida en PSA durante 20 minutos en hielo. Los anticuerpos intracelulares o sus isotipos control se incubaron a 4 °C durante toda la noche en saponina 0,1% diluida en PSA. Finalmente, las células se fijaron nuevamente con PFA al 2% como se describió previamente. Los anticuerpos, sondas y marcadores de viabilidad utilizados se detallan en la Tabla 4. La adquisición de las muestras se realizó en citómetros Cyan (*Beckman Coulter*), Aurora (*Cytek*) o Attune Nxt (*Thermo Fisher* según disponibilidad y se analizaron con el software FlowJo Vx.

## **24. Análisis Estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). La normalidad de los datos se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk. Para comparar dos grupos, se aplicó el t-test de Student no pareado cuando los datos eran normales, y el test de Mann-Whitney en caso contrario. Cuando los valores se normalizaron respecto a un control, se utilizó el one-sample t-test o el test de Wilcoxon según la distribución estadística de las muestras. Para datos pareados se empleó el Wilcoxon signed rank-test. En experimentos con tres o más grupos se aplicó ANOVA de una vía y en experimentos con más de una variable se utilizó ANOVA de dos vías, ambas con corrección para comparaciones múltiples según se indicó en los pies de figura. Las curvas de supervivencia se analizaron mediante el test de log-rank (Mantel-Cox). Los estudios de correlación se realizaron utilizando el test de correlación de Pearson. Se consideraron significativos los valores de  $p < 0.05$ .

## 25. Reactivos

La Tabla 3 presenta los materiales y reactivos utilizados en los distintos ensayos experimentales, mientras que la Tabla 4 detalla los reactivos empleados en ensayos de citometría de flujo.

**Tabla 3.** Materiales y reactivos generales

Reactivos	No Catálogo	Proveedor
<b>Reactivos generales</b>		
Adyuvante Completo de Freund	231131	BD Biosciences
Anticoagulante W	1898552	Wiener Lab
Asante NaTRIUM Green-2	ab142802	Abcam
ATP	10127531001	Roche
Beads magnéticas estreptavidina	88816	Thermo Fisher Scientific
Brefeldina A	420601	Biologend
Carbonato de litio	62470	Sigma-Aldrich
Colagenasa D	11088858001	Roche
DAPI	D9542	Sigma-Aldrich
DNasa I	D4527	Sigma-Aldrich
DPX	06522	Sigma-Aldrich
Estreptavidina-Alexa Fluor 568	S11226	Invitrogen
Estreptavidina-DTAF	PNIM0307	Beckman-Coulter
Estreptavidina-FITC	11-4317-87	Invitrogen
Fast SYBR Green Master Mix	4385616	Applied Biosystems
Ficoll-Paque	GE17-5446-02	Merck
Fura-2 sonda	F1201	Invitrogen
Galectina-1	N/A	Laboratorio de Glicomedicina (IBYME)
GM-CSF	N/A	Sobrenadante de cultivo de células COS transfectadas con GM-CSF murino
GoScript RT cDNA Synthesis Kit	A5001	Promega
HEPES	15630080	Invitrogen
Ionomycin	I0634	Sigma-Aldrich
Isoqueracetina (ISQ)	IQC-950AN	Quercegen Pharmaceuticals LLC
L-glutamina	25030081	Invitrogen
Lipofectamina LTX con agente plus	15338100	Invitrogen
LPS	L3491	Sigma-Aldrich
Luxol Fast Blue	S3382	Sigma-Aldrich
Medio RPMI 1640 GlutaMAX	61870010	Invitrogen
MEM-aminoácidos no esenciales	11140050	Invitrogen
MOG 35-55	LT12018, LT051716	LifeTein
Mycobacterium Tuberculosis H37Ra	231141	BD Biosciences
M-MLV Reverse Transcriptase	28025013	Invitrogen
Nigericina	N7143	Sigma-Aldrich

Ovoalbumina Alexa Fluor 647	O34784	Invitrogen
Penicilina/Estreptomicina	15140122	Invitrogen
Percoll	P1644	Sigma-Aldrich
Piruvato de sodio	11360070	Invitrogen
PMA	P8139	Sigma-Aldrich
Primers aleatorios	48190011	Invitrogen
Prolong Gold	P36930	Sigma-Aldrich
Saponina	84510	Sigma-Aldrich
Suero Fetal Bovino	10270106	Invitrogen
SYBR Green Supermix	1725271	Bio-Rad
Toxina <i>Bordetella Pertussis</i>	180	List Biological Laboratories
TRIzol	15596026	Invitrogen
β-mercaptopetanol	M6250	Merck
<b>Kits Comerciales</b>		
FLICA-660 Caspase-1 Assay	9122	ImmunoChemistry Technologies
Kit ELISA IL-1β (humanos)	557953	BD Biosciences
Kit ELISA Caspasa-1 (humanos)	DCA100	R&D Systems
Kit ELISA IL-1β (ratón)	432603	Biolegend
Kit ELISA IL-1β (humanos medio condicionado)	DY201	R&D Systems
Kit multiplex para citoquinas	740809	Biolegend
Estreptavidina-Alexa Fluor 568	S11226	Invitrogen
Estreptavidina-FITC	11-4317-87	Invitrogen
Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V	VCA-1003	Lonza
<b>Anticuerpos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i></b>		
Alexa Fluor 488 anti-ratón IgG	A-11029	Invitrogen
Anti-cabra Alexa Fluor 555	A21432	Invitrogen
Anti-caspasa-1 (Gasper-1)	AG-20B-0042	AdipoGen
Anti-CD8α	BE0117	Bio X Cell
Anti-conejo Alexa Fluor 488	A11008	Thermo Fisher
Anti-conejo biotinilado	SAB3700936	Sigma-Aldrich
Anti-Gal-1	n/a	Laboratorio de Glicomedicina (IBYME)
anti-V5-HRP	460708	Invitrogen
Anti-lba1	NB1001028	Novus Biologicals
Anti-lba1	01919741	Wako
Anti-IL-1β	AF-401-NA	R&D Systems
Anti-IL-1β (H-153)	sc-7884	Santa Cruz Biotechnology
Anti-MHC clase II	MCA45R	Serotec/Bio-Rad
Anti-PD-1	BP0146	Bio X Cell
Anti-ratón Alexa Fluor 546	A11030	Thermo Fisher
Anti-TMEM176B	19825-1	Proteintech
Anti-TMEM176B (rabbit polyclonal)	ab103929	Abcam
IgG normal de cabra	AB-108-C	R&D Systems
IgG2a de rata	BP0089	Bio X Cell
IgG2b de ratón	MPC-11	Bio X Cell

**Tabla 4.** Anticuerpos y sondas de citometría de flujo

<b>Anticuerpos Humano</b>				
<b>Antígeno</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clon</b>	<b>Código</b>	<b>Proveedor</b>
TCR α/β	APC	IP26	306718	Biolegend
CD3	BV421	OKT3	317343	Biolegend
CD38	FITC	HIT2	303504	Biolegend
CD4	APC	SK3	344613	Biolegend
CD8	PE-Cy7	SK1	344711	Biolegend
CD8	APC-Cy7	SK1	344714	Biolegend
HLA-DR	PE-Cy7	L243	307616	Biolegend
IFN-γ	Brilliant Violet 605	B27	506541	Biolegend
PD-1	Pacific Blue	EH12.2H7	329916	Biolegend
TNF-α	Alexa Fluor 700	MAb11	502928	Biolegend
TOX	PE	TXRX10	130-120-785	Miltenyi
<b>Isotipos control</b>				
REA Control Antibody, human IgG1	PE	REA293	130-113-450	Miltenyi
Mouse IgG1 kappa	Brilliant Violet 605	MOPC-21	400161	Biolegend
Mouse IgG1 kappa	Alexa Fluor 700	MOPC-21	400144	Biolegend
<b>Anticuerpos Ratón</b>				
<b>Antígeno</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clon</b>	<b>Código</b>	<b>Proveedor</b>
CD101	Alexa Fluor 700	Moushi101	56-1011-82	Invitrogen
CD11b	Brilliant Violet 605	M1/70	101237	Biolegend
CD11b	PerCpCy5.5	M1/70	101228	Biolegend
CD11c	Brilliant Violet 605	N418	117333	Biolegend
CD19	PerCpCy5.5	1D3/CD19	152406	Biolegend
CD3	PerCpCy5.5	145-2C11	100328	Biolegend
CD4	Brilliant Violet 785	RM4-5	100551	Biolegend
CD44	Brilliant Violet 605	IM7	103047	Biolegend
CD44	APC	IM7	103012	Biolegend
CD45.2	Brilliant Violet 711	104	109847	Biolegend
CD45.2	APC-Cy7	104	560694	BD Biosciences
CD73	PE-Cy7	TY/11.8	127230	Biolegend
CD8	APC-Cy7	53-6.7	100714	Biolegend
CD86	FITC	GL-1	105011	Biolegend
CX3CR1	Brilliant Violet 510	SA011F11	149025	Biolegend
IFN-γ	FITC	XMG1.2	505806	Biolegend
Ly6C	Alexa Fluor 488	HK1.4	128021	Biolegend
Ly6C	Brilliant Violet 510	HK1.4	128033	Biolegend
Ly6G	PE	1A8	127607	Biolegend
Ly6G	PE-Cy7	1A8	127617	Biolegend
IA-IB (MHC-II)	PE-Cy7	M5/114.15.2	107630	Biolegend

PD1	PE	29F1.1A12	135205	Biolegend
PD1	PE-Cy7	RMP1-30	109110	Biolegend
ROR $\gamma$ T	PE-eFLUOR610	AFKJS-9	61-6988-82	Invitrogen
TCF1	Alexa Fluor 488	CD63D9	6444S	Cell Signaling Technology
TCR $\beta$	FITC	H57-597	109206	Biolegend
TCR $\beta$	Pacific Blue	H57-597	109226	Biolegend
TOX	eFluor660	TXRX10	50-6502-82	Invitrogen
TOX	PE	TXRX10	12-6502-82	Invitrogen
<b>Isotipos Control</b>				
Rat IgG2a Kappa	eFluor660	eBR2a	50-4321-82	Invitrogen
Rat IgG1 kappa	PE-eFluor610	eBRG1	61-4301-82	Invitrogen
Rat IgG2a Kappa	PE	eBR2a	12-4321-80	Invitrogen

### Tetrámeros

Antígeno, Secuencia, Haplótipo	Fluorocromo	Código	Proveedor
MOG 37-50, VGWYRSPFSRVVHL, H2-Db	Brilliant Violet 421	-	NIH Tetramer Core Facility
MHV-Spike protein 598- 605, RCQIFANI, H-2Kb	PE	-	NIH Tetramer Core Facility

### Sondas

	Fluorescencia	Código	
Zombie	Aqua	423101	Biolegend
Zombie	Yellow	423103	Biolegend
Zombie	Violet	423113	Biolegend
Zombie	NIR	423105	Biolegend
Caspasa-1	FLICA 660	9122	Immunochemistry Technologies
DDAO		C34554	Invitrogen

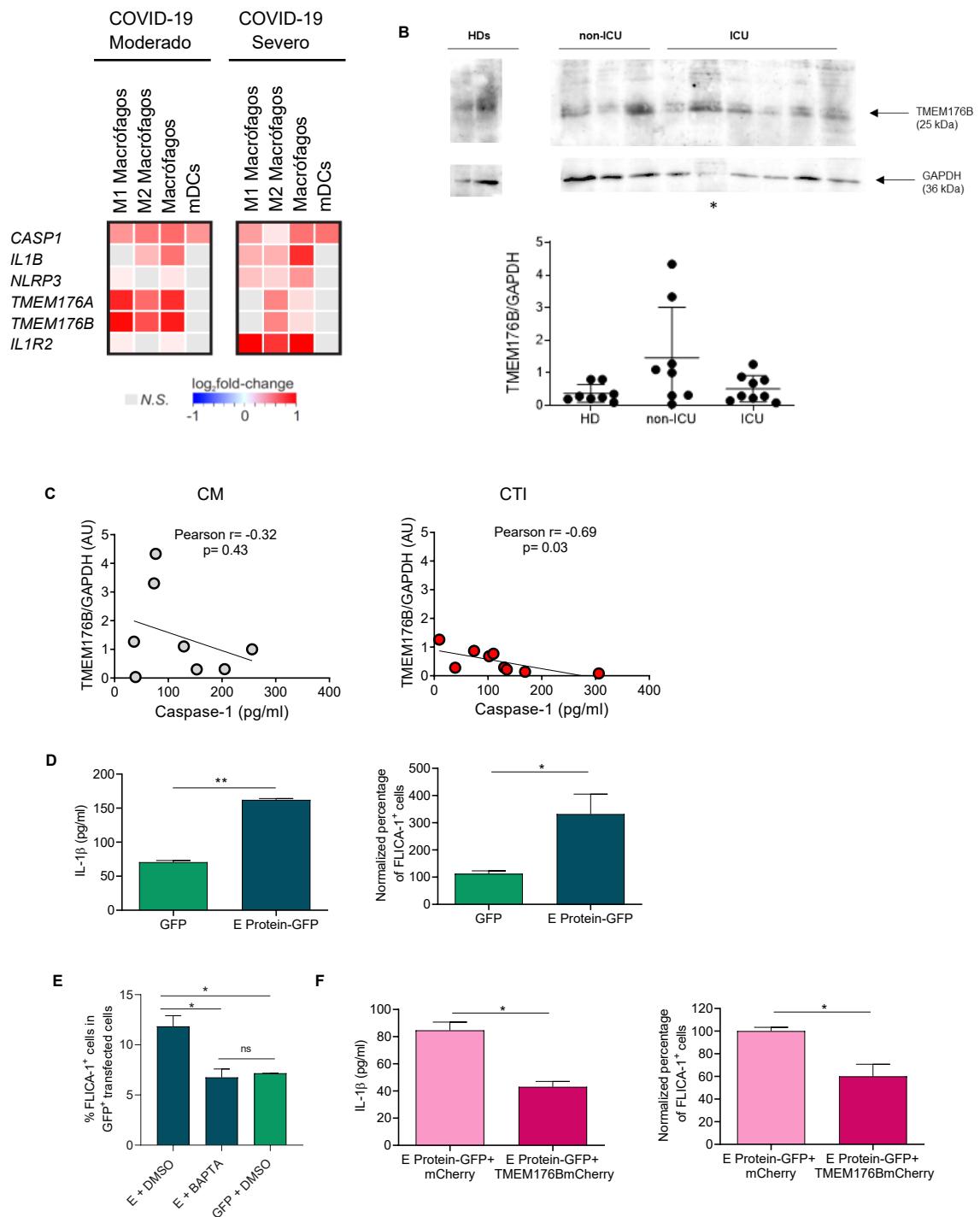
## Resultados

### 1. TMEM176B actúa como un canal catiónico inmunorregulador en la infección severa por β-coronavirus

1.1 - *TMEM176B tiene un rol protector en la infección por β-coronavirus a través de la inhibición del inflamasoma*

La activación del inflamasoma, en particular del NLRP3, se ha asociado con un rol patogénico en la COVID-19 severa, aunque sus mecanismos aún no están completamente caracterizados <sup>72,144</sup>. En este contexto, especulamos que TMEM176B podría ejercer un rol protector al inhibir la activación del inflamasoma inducida por β-coronavirus. Esto podría representar un enfoque terapéutico para reducir la inflamación exacerbada y la inmunopatología asociada. Para comenzar a explorar el rol de TMEM176B en la infección por SARS-CoV-2, se analizaron datos transcriptómicos públicos del lavado brocoalveolar (BAL) de pacientes con COVID-19 moderada y severa en colaboración con el Dr. Helder Nakaya <sup>263</sup>. En estos, se encontró que *TMEM176B* y su gen homólogo *TMEM176A* estaban significativamente disminuidos en macrófagos del BAL de pacientes con enfermedad severa, en comparación con aquellos con enfermedad moderada (Figura 4A). Por otro lado, genes asociados al inflamasoma como *IL1B*, *NLRP3* Y *IL1R2* estaban sobreexpresados en los macrófagos de los pacientes con enfermedad severa (Figura 4A).

En base a estos datos se buscó determinar la expresión proteica de TMEM176B en los monocitos de sangre periférica (células CD14<sup>+</sup>) de donantes sanos, y pacientes internados en cuidados moderados (CM) o en el centro de terapia intensiva (CTI) de una cohorte uruguaya (Tabla 5A, B). Los monocitos se han visto aumentados en pacientes con COVID-19 y asociados con la severidad; además, en células CD14<sup>+</sup> se ha reportado que TMEM176B se expresa de forma diferencial en comparación con pacientes sanos <sup>264,265</sup>. En este punto, no observamos diferencias entre la expresión de TMEM176B en donantes sanos o pacientes de CTI o CM (Figura 4B).



**Figura 4. TMEM176B está implicado en la regulación del inflamasoma en la infección por SARS-CoV2.**

(A) Mapa de calor del análisis transcriptómico para los genes indicados en el lavado broncoalveolar de pacientes con COVID-19 moderada y severa. (B) Estudio por Western Blot de los ríacos Tmem176b/GAPDH en monocitos CD14+ de sangre periférica de donantes sanos (HDs: Healthy Donors), pacientes en cuidados moderados (non-ICU: *del inglés non-Intensive Care Unit*) y en CTI (Centro de cuidados intensivos, en inglés ICU) Panel superior: Western Blot representativo de las muestras analizadas. \* muestra no considerada por el bajo nivel de GAPDH. Panel inferior: Gráfica con los datos para todos los pacientes analizados. (C) Estudio de correlación entre la Caspasa-1 plasmática medida por ELISA (R&D #DCA100) y el ríacio TMEM176B/GAPDH analizado por western blot en monocitos CD14+ purificados. Las muestras se tomaron de pacientes COVID-19 en Centros de Terapia Intensiva (CTI) o Cuidados Moderados (CM). (D) La proteína de envoltura (E) del SARS-CoV2 induce la secreción de IL-1 $\beta$  y la activación de la Caspasa-1 en monocitos humanos THP-1. Células THP1 fueron transfectadas con un plásmido con la proteína E-GFP del SARS-CoV2 o GFP sola. La IL-1 $\beta$  se analizó en el sobrenadante celular por ELISA y se muestra un experimento representativo de tres \* p < 0.05; \*\* p < 0.01. Student's t test. La caspasa-1 activa se analizó por citometría de flujo con el reactivo FLICA-1. Se muestra un pool de n=3 experimentos \* p < 0.05. One sample t test (E) Se transfectaron células THP1 al igual que en D) en presencia del quelante de Ca<sup>2+</sup> BAPTA-AM (10  $\mu$ M). Se analizó la caspasa-1 por citometría de flujo con el reactivo FLICA-1. Se muestra un pool de n=3 experimentos.

\* p < 0.05. One-way ANOVA.  
(F) La sobre-expresión de *Tmem176b* inhibió la secreción de IL-1 $\beta$  y la activación de la Caspasa-1 en monocitos humanos THP-1. Células THP-1 fueron co-transfectadas con la proteína E del SARS-CoV2 y un plásmido con Tmem176b-mCherry o mCherry solo. La IL-1 $\beta$  se analizó en el sobrenadante celular por ELISA y se muestra un experimento representativo de tres \* p < 0.05; \*\* p < 0.01. Student's t test. La caspasa-1 activa se analizó por citometría de flujo con el reactivo FLICA-1. Se muestra un pool de n=3

**Tabla 5A. Características de pacientes uruguayos con COVID-19**

IQR: Rango intercuartil

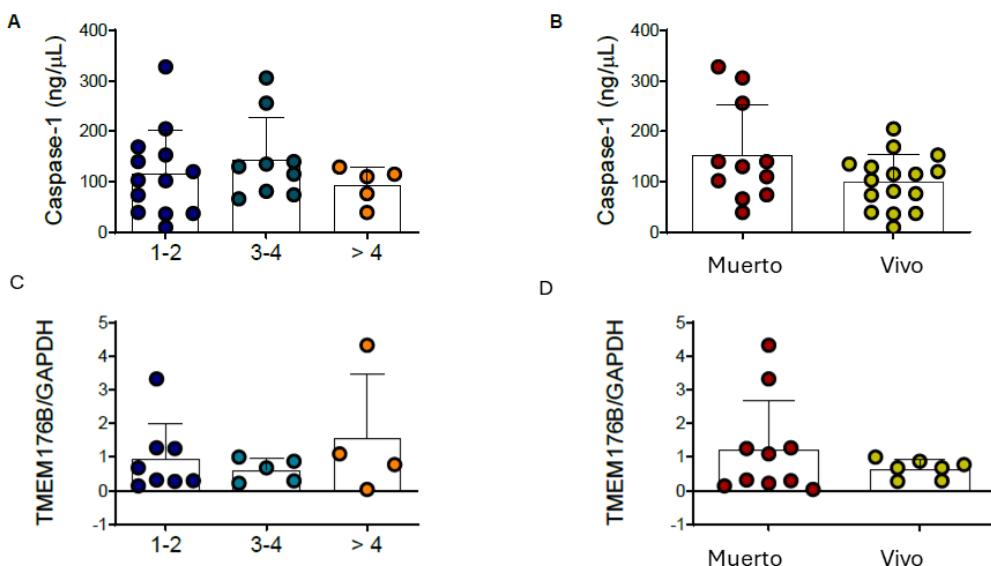
Característica	
No.	30
Edad, mediana (IQR), años	65.5 (53.0 – 76.0)
Sexo Masculino	22/30 (73.3 %)
Sexo Femenino	8/30 (26.7 %)
Duración de la hospitalización, mediana (IQR), días	18 (10 – 33)
WHO-CPS score, mediana (IQR)	8 (5 – 10)
Charlson co-morbidity index, median (IQR)	2 (1 – 3)
CTI	19/30 (63.3 %)
Cuidados Moderados	11/30 (36.7 %)
Temperatura, mediana (IQR), °C	37.8 (37.0 – 38.0)
Tasa respiratoria, mediana (IQR), bpm	25.5 (24.0 – 28.0)
SpO <sub>2</sub> , mediana (IQR), %	88.0 (86.0 – 89.0)
<b>Condiciones co-existentes</b>	10/30 (33.3 %)
Demencia	3/30 (10.0 %)
Diabetes mellitus	3/30 (10.0 %)
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	3/30 (10.0 %)
Insuficiencia Cardíaca	1/30 (3.3 %)
Enfermedades del tejido conectivo	1/30 (3.3 %)
Miocardiopatía Isquémica	1/30 (3.3 %)
<b>Tabquismo</b>	
No	26/30 (86.7 %)
Actual	1/30 (3.3 %)
Previo	3/30 (10.0 %)
<b>Parámetros de laboratorio, mediana (IQR)</b>	
PCR, mg/L	158.0 (107.8 – 196.0)
Dimeros D, µg/mL	1.8 (0.7 – 4.2)
Neutrófilos, células/µL	6100 (4500 – 9125)
Linfocitos, células/µL	850 (500 -1200)
Relación Linfocitos / Neutrófilos	0.14 (0.08 – 0.29)
Hemoglobina, g/dL	13.8 (13.4 – 15.7)
Plaquetas, número x10 <sup>3</sup> /µL	211.0 (176.0 – 262.5)
AST, IU/L	59.0 (44.0 – 76.0)
ALT, IU/L	46.0 (39.0 – 74.3)
Albumina, g/dL	3.7 (3.5 – 4.1)
Creatinina, mg/dL	1.1 (0.9 – 1.4)
Azotemia, mg/dL	48.0 (35.0 – 65.0)
Ferritina, mg/L	1354.0 (581.0 – 2545.5)
LDH, IU/L	467.5 (339.0 – 683.0)
<b>Número de muertes</b>	12/30 (40.0 %)

**Tabla 5B. Características de donantes sanos uruguayos**

IQR: Rango intercuartil

Característica	
No.	12
Edad, mediana (IQR), años	49 (46.5 – 59.2)
Sexo masculino	4/12 (33.3 %)
Sexo femenino	8/12 (66.7 %)

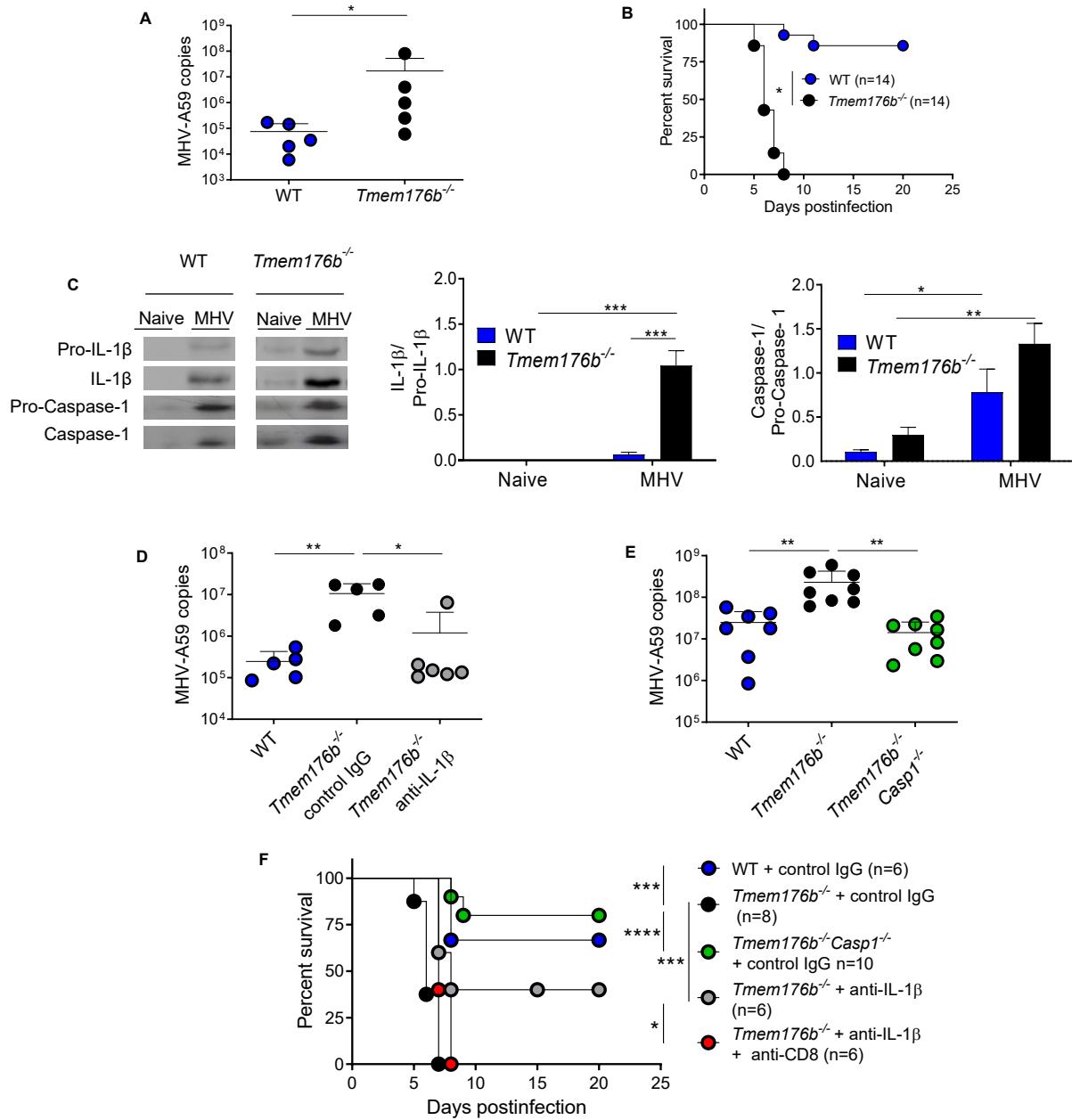
Luego, se analizó la presencia de Caspasa-1 activa en plasma de los pacientes y se correlacionó con la expresión de TMEM176B en los monocitos. Se observó que TMEM176B mostraba una correlación inversamente proporcional con la Caspasa-1 activa en plasma en pacientes de CTI y que esto no sucedía para los pacientes de CM (Figura 4C). Es de destacar que la expresión de TMEM176B en monocitos CD14<sup>+</sup> y la presencia de Caspasa-1 activa en plasma no se asociaron con la presencia de comorbilidad o mortalidad en nuestra cohorte (Figura 5). En su conjunto, estas observaciones sugieren que TMEM176B podría regular la activación del inflamasoma inducida por SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 severa. Para profundizar en esta hipótesis, decidimos poner atención en los mecanismos moleculares por los que el SARS-CoV-2 activa el inflamasoma. Como se delineó en los antecedentes, la proteína de envoltura (E) del SARS-CoV es capaz de activar al inflamasoma mediante mecanismos iónicos<sup>266</sup>. Por ende, especulamos que la proteína E del SARS-CoV-2 tendría un rol en la activación del inflamasoma por este coronavirus<sup>266,267</sup>. Para ello, se transfecaron monocitos humanos THP-1 con la proteína E del SARS-CoV-2 y se observó que esta inducía la secreción de IL-1 $\beta$  y la activación de caspasa-1 (Figura 4D). Asimismo, la quelación de Ca<sup>2+</sup> con BAPTA-AM inhibió la activación de la Caspasa-1 inducida por la proteína E, sugiriendo que este fenómeno dependería de la movilización de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Figura 4E). En acuerdo con esta dependencia iónica, la co-transfección de estas células con TMEM176B inhibió la activación del inflamasoma mediada por la proteína E (Figura 4F). En su conjunto, estos resultados apoyan un rol inhibitorio para TMEM176B en la activación del inflamasoma mediada por el SARS-CoV-2, que tendría especial relevancia en la COVID-19 severa.



**Figura 5. Estudio del índice de comorbilidad de Charlson y la mortalidad en función de la expresión de TMEM176B y la Caspasa-1 activa.**

(A-B) Análisis de la Caspasa-1 activa en plasma para cada paciente en función de su índice de comorbilidad de Charlson (A) y la presencia o no de mortalidad (B). (C-D) Análisis de la expresión de TMEM176B en monocitos CD14<sup>+</sup> para cada paciente en función de su índice de comorbilidad de Charlson (C) y la presencia o no de mortalidad (C).

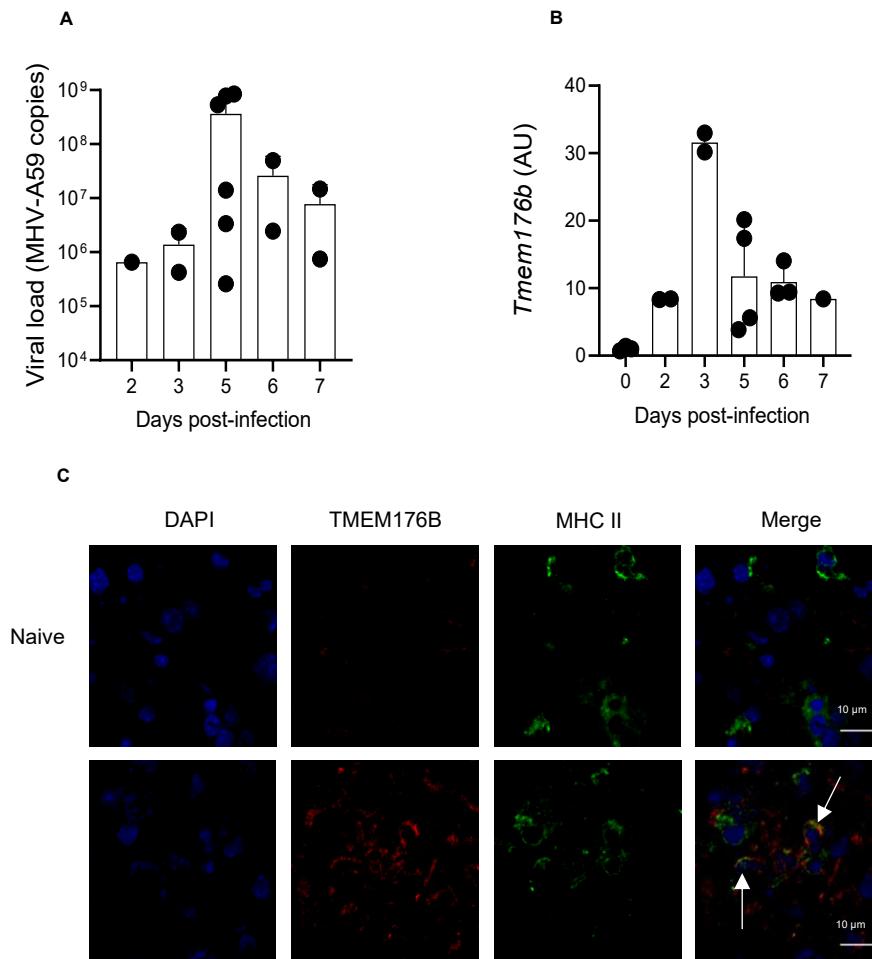
En este escenario, la utilización de un modelo murino de infección por  $\beta$ -coronavirus parecía natural para investigar en profundidad el rol de TMEM176B en la respuesta inmune. Para ello, empleamos la cepa MHV-A59, disponible en nuestro laboratorio y caracterizada por compartir mecanismos inmunes innatos y adaptativos con el SARS-CoV-2<sup>268-274</sup>. Este modelo fue puesto a punto por la Dra Maite Duhalde durante su post-doctorado, con quien colaboramos activamente en el desarrollo de esta tesis. Se infectaron ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> con MHV-A59 y se observó que la deleción de *Tmem176b* se asoció con una disminución en la sobrevida y un aumento en la carga viral (Figura 6A,B). Esto fue acompañado por una mayor activación de Caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en los hígados de ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (Figura 6C), lo que nos llevó a especular que la activación del inflamasoma podría explicar la mayor severidad en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. En acuerdo, el bloqueo de la IL-1 $\beta$  y la deleción de Caspasa-1 disminuyó la carga viral (Figura 6D,E) y recuperó la sobrevida en estos animales (Figura 6F).



**Figura 6. *Tmem176b* protege de la infección por el  $\beta$ -coronavirus MHV-A59 al inhibir la activación del inflammasoma.**

(A) Estudio de la carga viral en ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> por RT-qPCR en el hígado de los animales 5 días post-infección \*  $p<0.05$ . Student's *t* test. (B) Análisis de la sobrevida en ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> durante 20 días a partir de la infección con MHV-A59. \*  $p<0.05$ . Log-rank (Mantel-Cox) test. (C) Análisis por Western Blot de proteínas relacionadas al inflammasoma en el hígado de ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> infectados con MHV-A59. Los ratones se sacrificaron 5 días post-infección. Los hígados fueron procesados, lisados y estudiados por Western Blot para analizar la expresión de IL-1 $\beta$  y Caspasa-1. Se muestra la cuantificación para el ratio de las bandas IL-1 $\beta$ /pro-IL-1 $\beta$  (panel central) o Caspasa-1/pro-Caspasa-1 (panel derecho). Se muestra un n=2 para ratones naive en WT o *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y un n=3 para animales infectados WT o *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ . Two-way ANOVA test. (D) Se analizó la carga viral por RT-qPCR en el hígado de ratones WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> tratados con IgG control y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> tratados con anti-IL-1 $\beta$  5 días post-infección con MHV-A59. \*  $p<0.05$ . \*\*  $p<0.01$ . One-way ANOVA test. (E) Se analizó la carga viral por RT-qPCR en el hígado de ratones of WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> Casp1<sup>-/-</sup> 5 días post-infección. \*\*  $p<0.01$ . One-way ANOVA test. (F) Se estudió la sobrevida de ratones WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> Casp1<sup>-/-</sup> infectados con MHV-A59 y bajo los tratamientos indicados. Se inyectó 1  $\mu$ g de IgG control anti-IL1  $\beta$  i.p. cada 5 días a partir del día -2 tomando la infección como día 0. Además, se inyectaron 100  $\mu$ g de anti-CD8 cada 3 días a partir del día -2. \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ ; \*\*\*\*  $p<0.0001$ . Log-rank (Mantel-Cox) test

A continuación, procedimos a estudiar la carga viral y la expresión de este gen en los hígados de los animales infectados. Observamos que la carga viral presentó un máximo en el hígado a día 5 post-infección (Figura 7A) y que la infección aumentó la expresión de *Tmem176b* en el hígado de animales WT, al menos en células MHC-II<sup>+</sup> (Figura 7B,C). Estos resultados muestran que *Tmem176b* se induce de forma temprana, antes de alcanzar el máximo de la carga viral, y que su expresión se encuentra enriquecida en células MHC-II<sup>+</sup> como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. En su conjunto, estos hallazgos muestran un rol protector para TMEM176B tanto en la infección por SARS-CoV-2 en humanos, como de MHV-A59 en ratón, que dependería de la inhibición del inflamasoma. En este escenario, nos propusimos caracterizar los mecanismos inmunológicos subyacentes al eje *Tmem176b*-inflamasoma, iniciando su estudio en el modelo de infección por MHV-A59.



**Figura 7. La expresión de Tmem176b es inducida por la infección viral con MHV-A59.**

(A) Análisis de la carga viral por RT-qPCR en el hígado de ratones WT a distintos días post-infección (B) Análisis de la expresión de *Tmem176b* por RT-qPCR en el hígado de ratones WT a distintos días post-infección. Se reporta el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  relativo a la expresión de *Gapdh* (C) Inmunofluorescencia del hígado de ratones infectados con MHV-A59 o naïve. El tejido se tiñó con anti-MHC II o anticuerpos Tmem176b y el núcleo se marcó con DAPI. El análisis se realizó mediante microscopía confocal (Zeiss 880) y procesamiento posterior en ImageJ. Los animales fueron sacrificados 5 días post-infección. Las flechas indican las células MHCII+Tmem176b+. Las imágenes mostradas son representativas de 4 animales naïve y 4 animales infectados.

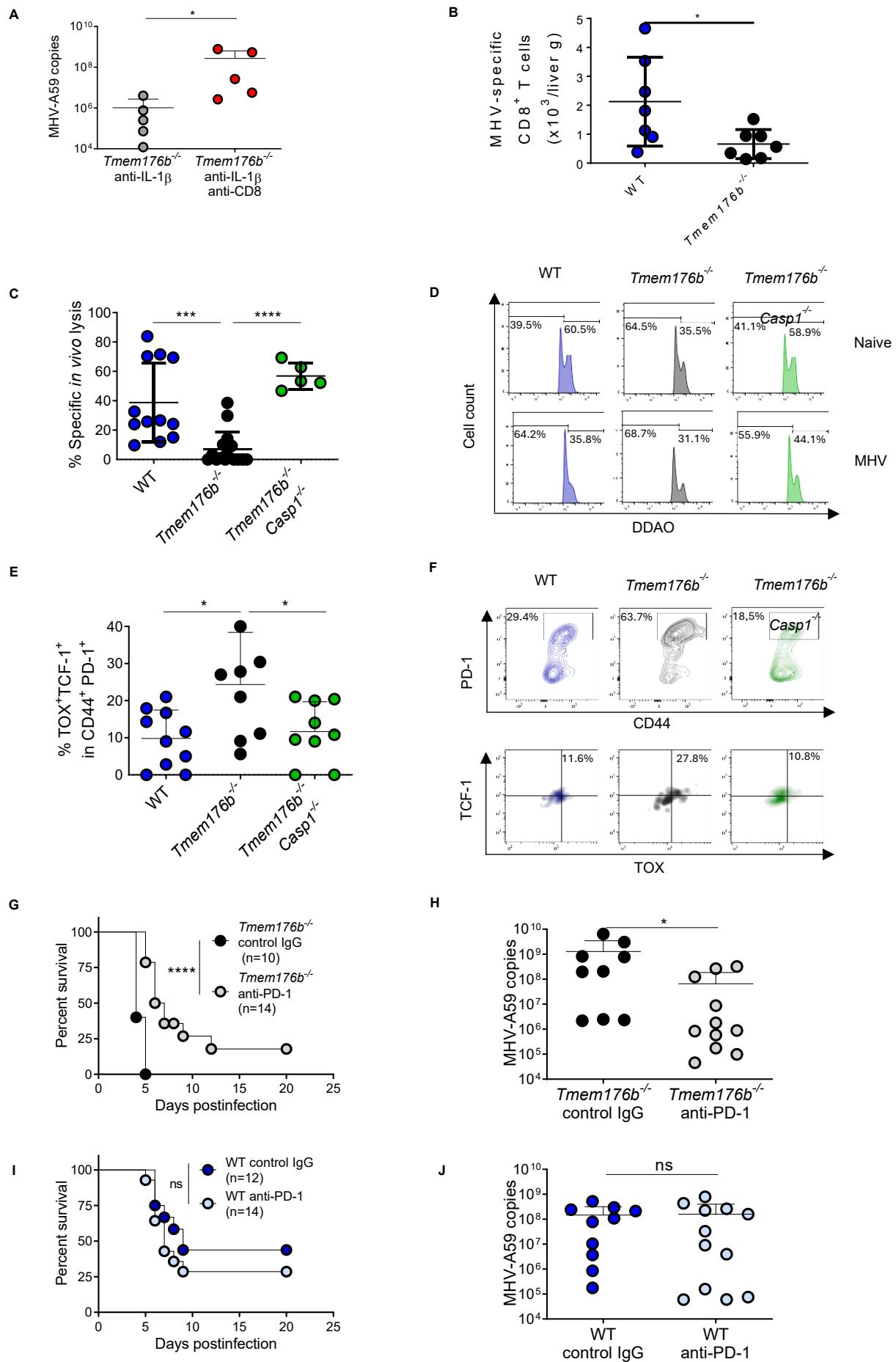
## 1.2 - La activación del inflamasoma en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> induce un estado de agotamiento en linfocitos T CD8<sup>+</sup>

La caracterización de *Tmem176b* como un factor protector del huésped en la infección por MHV-A59 nos llevó a preguntarnos cuáles eran los mecanismos inmunológicos implicados en este modelo. De manera interesante, resultados obtenidos por Maite Duhalde mostraban que la depleción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> impedía la mejora en la sobrevida y el control en la carga viral inducida por el bloqueo de IL-1 $\beta$  (Figura 8A). Además, los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> tenían menos linfocitos T CD8<sup>+</sup> MHV-específicos (Figura 8B). En este contexto, nos propusimos estudiar la funcionalidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> mediante un ensayo de citotoxicidad celular *in vivo*. Observamos que los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> presentaron una capacidad reducida para inducir citotoxicidad celular MHV-específica (Figura 8C). A su vez, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>-Caspasa-1 recuperaron esa capacidad citotóxica, mostrando que la disminución de la citotoxicidad celular *in vivo* en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> depende de la activación del inflamasoma (Figura 8D). Esto nos llevó a preguntarnos cuáles eran los mecanismos por los que el inflamasoma podía modular las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Se ha reportado que las citoquinas derivadas de la activación del inflamasoma son capaces de modular el agotamiento T<sup>119,275</sup>. Si bien este fenómeno se ha reportado en distintos contextos de infección viral crónica y en el cáncer, al momento de escribir esta tesis aún se discutía si en la COVID-19 los linfocitos T estaban agotados o altamente activados<sup>276</sup>.

Hipotetizamos entonces que la activación del inflamasoma podría estar induciendo el agotamiento en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> infectados con MHV-A59. En acuerdo, observamos un aumento en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> exhaustos progenitores (CD44<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> TCF1<sup>+</sup> TOX<sup>+</sup>) en los hígados de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> en comparación con animales WT, mientras que esta diferencia se perdió en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> Caspasa-1<sup>-/-</sup> (Figura 8E, F). Estos resultados nos llevaron a proponer que el fenotipo exhausto podía ser rescatado mediante el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1, puesto que el anti-PD-1 es capaz de revertir parcialmente el agotamiento T en infecciones virales crónicas<sup>277</sup>. De manera más

específica, la sub-población de linfocitos T exhaustos progenitores es la que responde al bloqueo de anti-PD-1 en el contexto inmune anti-tumoral<sup>105</sup>.

En concordancia, la administración de anti-PD-1 disminuyó la carga viral y recuperó la sobrevida de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (Figura 8G, H) pero no de animales WT (Figura 8I, J). En suma, nuestras observaciones muestran que existiría un mecanismo patogénico dependiente del inflamasoma que induce el agotamiento de las células T y que es regulado por *Tmem176b* al menos en la infección por MHV-A59 y que podría ser relevante en humanos.



**Figura 8. Los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> generan linfocitos T exhaustos en forma dependiente del inflamasoma en la infección por MHV-A59.**

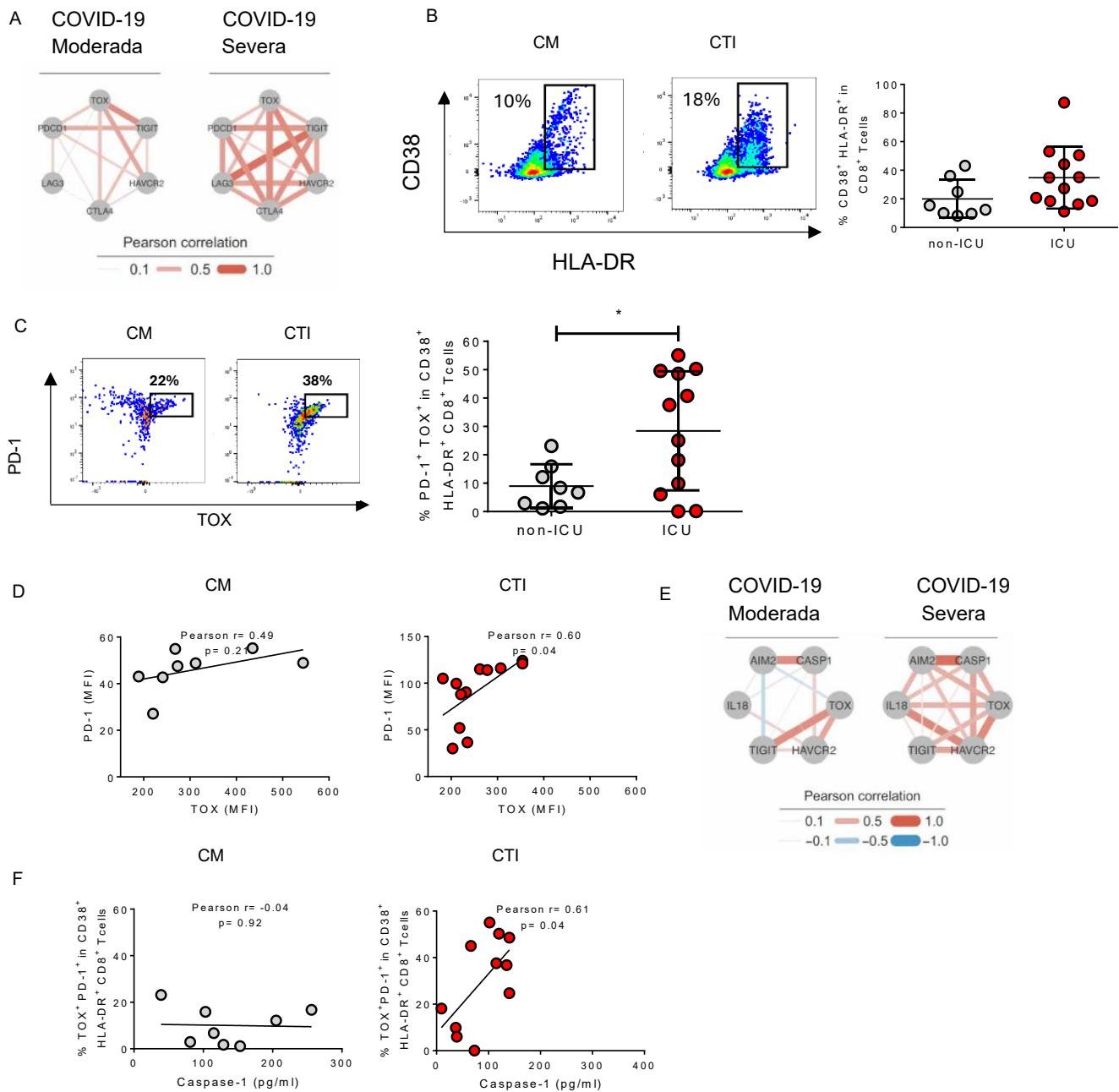
(A) Se estudió la carga viral por RT-qPCR en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> infectados con MHV-A59 y tratados con anti-IL-1 $\beta$  o anti-IL1 $\beta$  + anti-CD8. Se inyectó 1  $\mu$ g de IgG control anti-IL1  $\beta$  i.p. cada 5 días a partir del día -2 tomando la infección como día 0. Además, se inyectaron 100  $\mu$ g de anti-CD8 cada 3 días a partir del día -2. Las cargas virales se estudiaron en los hígados 5 días post-infección. *Mann-Whitney test.* \*  $p < 0.05$ . (B) Se estudió el infiltrado T CD8+ MHV-específico en el hígado de animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> por citometría de flujo. \*  $p < 0.05$  *Student's t-test*. (C) Se estudió la citotoxicidad celular *in vivo* dependiente de linfocitos T CD8+ MHV-A59 específicos. Se muestran los porcentajes de lisis específica para ratones WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Caspasa-1*<sup>-/-</sup> 5 días post-infección. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . *One-way ANOVA test*. (D) Histogramas representativos de los experimentos mostrados en C (E) Se analizaron por citometría de flujo los hígados de animales WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Caspasa-1*<sup>-/-</sup> en búsqueda de poblaciones T exhaustas. Se muestran los porcentajes de células TOX+TCF-1+ en PD-1+CD44+, dentro de los linfocitos T CD8+ MHV-A59 específicos. En el análisis se observan animales de dos experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ . *One-Way ANOVA test*. (F) Histogramas representativos de los experimentos mostrados en E (G) Sobrevida de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> infectados con MHV-A59 y tratados con IgG control o anti-PD-1. Se inyectaron 200  $\mu$ g i.p. de anti-PD-1 o IgG control cada 2 días desde el día -2. \*\*\*  $p < 0.0001$ . *Log-rank (Mantel-Cox) test*. (H) Carga viral en el hígado de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> infectados con MHV-A59 5 días post-infección y tratados con IgG control o anti-PD-1. \*  $p < 0.05$ . *Mann-Whitney test*. (I) Sobrevida de animales *Tmem176b* WT infectados con MHV-A59 y tratados con IgG control o anti-PD-1. Se inyectaron 200  $\mu$ g i.p. de anti-PD-1 o IgG control cada 2 días desde el día -2. ns = no significativo. *Log-rank (Mantel-Cox) test*. (J) Carga viral en el hígado de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> infectados con MHV-A59 5 días post-infección y tratados con IgG control o anti-PD-1. ns = no significativo. *Mann-Whitney test*.

### 1.3 – El eje inflamasoma/disfunción T se asoció con la severidad en la COVID-19

Las observaciones en el modelo murino de MHV-A59 nos llevaron a estudiar si la activación del inflamasoma y la disfunción de células T CD8<sup>+</sup> podría ser causa de severidad en la COVID-19. En primer lugar, realizamos una aproximación bioinformática con datos transcriptómicos públicos de células mononucleares de sangre periférica <sup>278</sup>. Las células T exhaustas se caracterizan por co-expresar altos niveles de PD-1 (codificado por el gen *PDCD1*) junto con otros receptores inhibidores como LAG3 (*LAG3*), CTLA-4 (*CTLA4*), TIM-3 (*HAVCR2*), TIGIT (*TIGIT*) entre muchos otros <sup>279</sup>. Típicamente, cuanto más alto sea el número de receptores inhibidores co-expresados, más severo será el estado de agotamiento. Además, la expresión de PD-1 y el agotamiento de células T estarían dirigidos por altos niveles del regulador transcripcional TOX (Del Inglés: *Thymocyte selection-associated high mobility group box*) <sup>280–283</sup>. En ese sentido, los análisis bioinformáticos realizados en colaboración con el Dr. Helder Nakaya mostraron que existía una fuerte correlación entre la expresión de *PDCD1* y *TOX* junto con la de otros receptores co-inhibidores (*LAG3*, *CTLA4*, *HAVCR2*, *TIGIT*) en pacientes con COVID-19 severa, mientras que esto no sucedía para pacientes con COVID-19 moderada (Figura 9A).

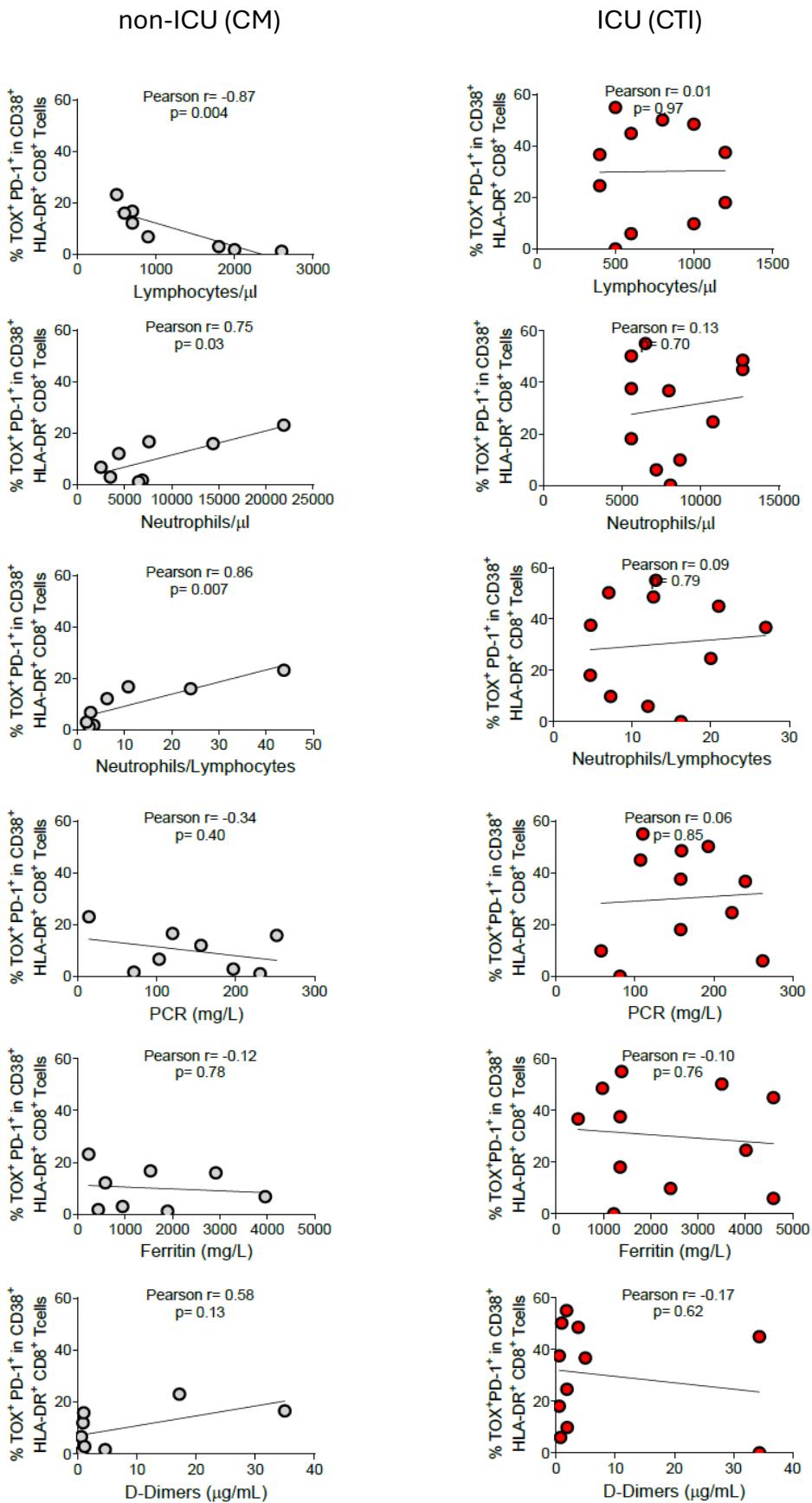
Luego, en nuestra cohorte, procedimos a analizar la activación de células T CD8<sup>+</sup> (CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) y la presencia de células PD-1<sup>+</sup> TOX<sup>+</sup> en donantes sanos, pacientes de CM o CTI. Si bien no encontramos diferencias a nivel de la activación, se observó un aumento de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> TOX<sup>+</sup> (en CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) en pacientes de CTI en comparación con los de CM (Figura 9B, C). Además, se evidenció una fuerte correlación entre la intensidad de fluorescencia media de PD-1 y TOX en células HLA-DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> en los pacientes de CTI pero no de CM (Figura 9D). Este aspecto es importante porque se ha propuesto que los niveles de expresión de TOX podrían diferenciar células agotadas de memoria, siendo las primeras las que alcanzan niveles de expresión más elevados <sup>281,283,284</sup>. Así, nuestros resultados sugieren que la expresión de PD-1 está dirigida por la expresión de TOX y que los pacientes con una enfermedad más severa tendrían linfocitos T CD8<sup>+</sup> disfuncionales o exhaustos. A su vez, nos preguntamos si este estado disfuncional

podía ser desencadenado por la activación del inflamasoma en la infección por SARS-CoV-2. En acuerdo, los análisis bioinformáticos de la cohorte de McClain mostraron que el agotamiento y genes asociados al inflamasoma estaban altamente correlacionados en pacientes con COVID-19 severa pero no con una enfermedad moderada (Figura 9E). Del mismo modo, en nuestra cohorte la presencia de células T PD-1<sup>+</sup> TOX<sup>+</sup> (en HLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> - CD8<sup>+</sup>TCRb<sup>+</sup>) correlacionaron con la presencia de Caspasa-1 activa en el plasma de pacientes de CTI, pero no de CM (Figura 9F). De manera interesante, esta correlación no se observó para otros parámetros inflamatorios en los pacientes de CTI (ICU) (Figura 10). Estos hallazgos sugieren que la activación del inflamasoma induce un estado agotado o disfuncional en las células T CD8<sup>+</sup>, lo que representaría un posible mecanismo patogénico en la enfermedad severa. Este fenómeno parece estar conservado entre especies, en concordancia con lo observado en la infección por el  $\beta$ -coronavirus murino, donde las células T CD8<sup>+</sup> muestran un estado disfuncional que les impide controlar eficazmente la infección viral. En este escenario, la modulación del agotamiento podría constituir una estrategia terapéutica.



**Figura 9. Las células T exhaustas aumentan en la COVID-19 severa y correlacionan con la Caspasa-1 activa.**

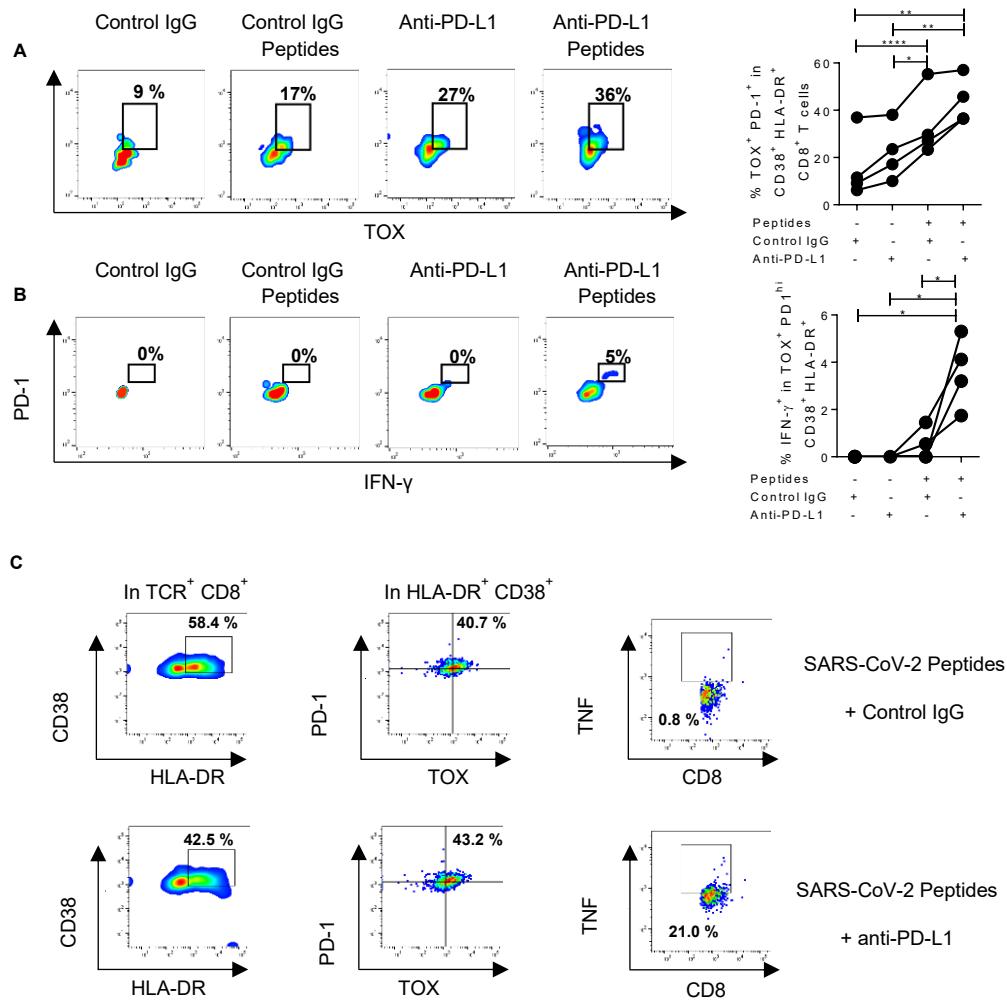
(A) *Network plot* (gráfico de red) representando las correlaciones de Pearson de los genes indicados, asociados al agotamiento de células T, a partir de datos transcriptómicos de células de sangre periférica de la cohorte de McClain et. al. para COVID-19 severa o moderada (B) Panel izquierdo: *Dot-plots* representativos de citometría de flujo del análisis de células CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> dentro de las CD8<sup>+</sup>TCRb<sup>+</sup> Panel derecho: porcentajes individuales de células CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> dentro de las CD8<sup>+</sup>TCRb<sup>+</sup> para cada paciente estudiado en CM (*non-ICU*, del inglés *non-Intensive Care Unit*) o CTI (*ICU*). \**p*<0.05, *unpaired Student's t-test*. (C) Panel izquierdo: Dot-plots representativos de citometría de flujo del análisis de células PD-1<sup>+</sup>TOX<sup>+</sup> dentro de las células CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCRb<sup>+</sup> Panel derecho: porcentajes individuales de células PD-1<sup>+</sup>TOX<sup>+</sup> dentro de las células CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCRb<sup>+</sup> para cada paciente estudiado en CM o CTI. \**p*< 0.05, *unpaired Student's t test*. (D) Estudio de correlación para el MFI determinado por citometría de flujo para PD-1 y TOX, en las células CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCRb<sup>+</sup> en pacientes en CM o CTI. Se muestra el coeficiente de Pearson y el *p*-valor en cada caso. (E) *Network plot* (gráfico de red) representando las correlaciones de Pearson de los genes indicados, asociados al agotamiento de células T y al inflamasoma, a partir de datos transcriptómicos de células de sangre periférica de la cohorte de McClain et. al. para COVID-19 severa o moderada. (F) Estudio de correlación para el porcentaje de células PD-1<sup>+</sup>TOX<sup>+</sup> en células CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCRb<sup>+</sup> y la Caspase-1 activa en pacientes en CM o CTI. Se muestra el coeficiente de Pearson y el *p*-valor en cada caso.



**Figura 10. Estudio de correlación para la presencia de células TOX<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> dentro de las células T CD8<sup>+</sup> activadas en función de distintos parámetros inflamatorios.**

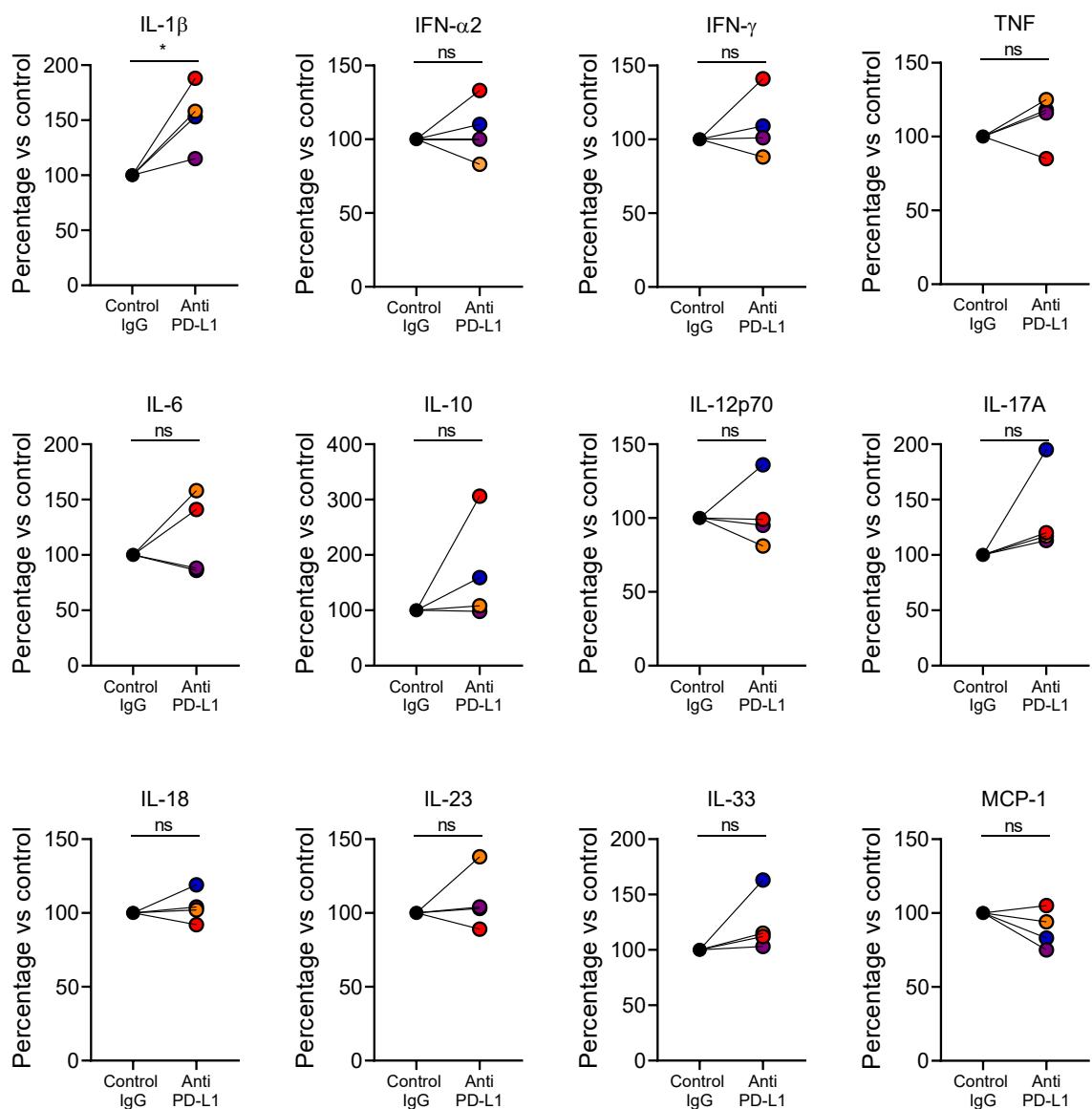
Se muestra el estudio de correlación para el porcentaje de células PD-1<sup>+</sup>TOX<sup>+</sup> dentro de las células CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCRb<sup>+</sup> y distintos parámetros inflamatorios como la presencia de linfocitos (Lymphocytes/ $\mu$ L) y neutrófilos en sangre (Neutrophiles/ $\mu$ L), así como el racio Neutrófilos/Linfocitos (Neutrophils/Lymphocytes), la proteína c reactiva (PCR), ferritina (ferritin) y D-dimeros (D-dimers) para cada paciente de CM (*non-ICU*) o CTI (*ICU*).

A continuación, procedimos a evaluar si el bloqueo de PD-L1 *in vitro* podía revertir la disfunción de células T en pacientes de CTI. Para esto, PBMCs de pacientes con COVID-19 en CTI se trataron con péptidos del SARS-CoV-2 en presencia o ausencia de un anticuerpo- $\alpha$ -PD-L1. El tratamiento con péptidos del SARS-CoV-2 se asoció un aumento en el porcentaje de células PD-1<sup>+</sup> TOX<sup>+</sup> (Figura 11A), pero no logró inducir significativamente la producción de IFN- $\gamma$  (Figura 11B). Por el contrario, el bloqueo de PD-L1 rescató la producción de IFN- $\gamma$  en estas células (Figura 11B), sin modificar el porcentaje de células PD-1<sup>+</sup> TOX<sup>+</sup> (Figura 11A). Resultados similares se observaron para la producción de TNF- $\alpha$  por citometría de flujo (Figura 11C). A su vez, el bloqueo de PD-L1 *in vitro* no se asoció con un aumento generalizado en la producción de citoquinas pro-inflamatorias en los sobrenadantes de PBMCs de pacientes críticos con COVID-19 (Figura 12). Estos resultados muestran que el bloqueo de PD-L1 *in vitro* es capaz de recuperar la disfunción de células T en pacientes con COVID-19 severo.



**Figura 11. Los linfocitos T exhaustos de pacientes con COVID-19 severa pueden ser modulados por anticuerpos anti-PD-L1.**

(A) Estudio de citometría de flujo del porcentaje de células PD-1 $^+$ TOX $^+$  dentro de las células T CD38 $^+$ HLA-DR $^+$ CD8 $^+$  de 4 pacientes de CTI con COVID-19. Las células se incubaron durante 24 horas con un IgG control (20  $\mu$ g/ml; human IgG1) o un anticuerpo anti-PD-L1. Luego, se agregaron 6 nmol de péptidos del SARS-CoV-2 por 6 horas. En el panel izquierdo se muestran dot-plots representativos y en el panel derecho se muestran los datos para 4 pacientes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ , One-Way ANOVA test. (B) Estudio de citometría de flujo de la producción de IFN-Y en células CD8 TCR- $\beta$  $^+$  CD38 $^+$ HLA-DR $^+$  PD-1 $^+$ TOX $^+$  de los mismos pacientes de CTI estudiados en (A) y bajo las mismas condiciones experimentales. En el panel izquierdo se muestran dot-plots representativos y en el panel derecho se muestran los datos para 4 pacientes. \* $p < 0.05$ , one-way ANOVA test. (C) Estudio de citometría de flujo de la producción de TNF- $\alpha$  en células CD8 TCR- $\beta$  $^+$  CD38 $^+$ HLA-DR $^+$  PD-1 $^+$ TOX $^+$  de tres pacientes en CTI con COVID-19, que fueron tratados como se describe en (A). Se muestran dot-plots representativos.



**Figura 12. Estudio de citoquinas secretadas al sobrenadante de PBMCs de pacientes en CTI.**

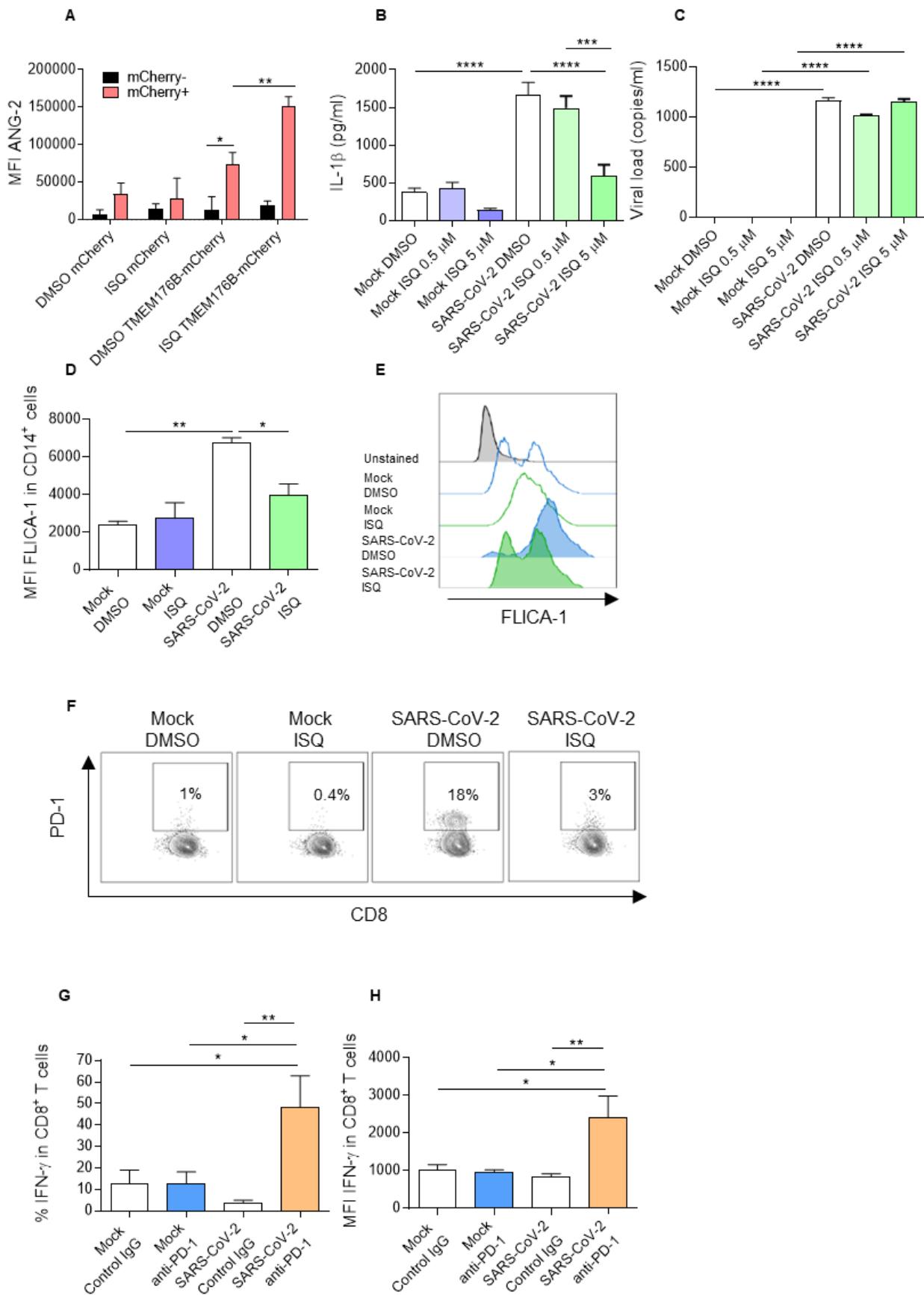
Los sobrenadantes de los cultivos de PBMCs empleados en la Figura 11A-B fueron evaluados para un conjunto de 12 citoquinas. Las células se incubaron durante 24 horas con IgG control (20  $\mu$ g/ml, IgG1 humana) o anticuerpo anti-PD-L1. Luego, se agregaron 6 nmol de péptidos de SARS-CoV-2 al cultivo por 6 horas. Las citoquinas se cuantificaron por citometría de flujo usando un kit multiplex basado en *beads* de captura. Los valores absolutos se estandarizaron en relación a la condición control (100%). ns= no significativo, \*  $p<0.05$ . One sample t-test.

#### 1.4 - La modulación farmacológica de TMEM176B *in vitro* modula el eje inflamasoma/disfunción T inducido por el SARS-CoV-2

Los resultados obtenidos hasta ahora demuestran que TMEM176B regula la activación del inflamasoma inducida por SARS-CoV-2 y MHV-A59, desempeñando un papel protector al mitigar la disfunción de las células T asociada con dicha activación. A partir de estos hallazgos, nos planteamos modular esta vía farmacológicamente *in vitro*. Hipotetizamos entonces, que si pudiésemos inducir la actividad iónica de TMEM176B podríamos bloquear la activación del inflamasoma inducida por el SARS-CoV-2 y así prevenir la disfunción de células T CD8<sup>+</sup>. En ese contexto identificamos un flavonoide, la isoqueracetina, capaz de inducir la actividad de transporte iónico específica de TMEM176B (Figura 13A). Dado que no contábamos con una instalación donde poder trabajar con el SARS-CoV-2, colaboramos con el grupo del Dr. Pedro Moraes (Laboratorio de Inmunometabolismo, Universidad de Campinas, SP, Brasil) que permitió evaluar el efecto de la isoqueracetina en monocitos humanos (CD14<sup>+</sup>) infectados con SARS-CoV-2. Se observó que el tratamiento con isoqueracetina inhibió la secreción de IL-1 $\beta$  y la activación de Caspasa-1 inducida por el SARS-CoV-2 (Figura 13B,D) sin afectar la carga viral (Figura 13C). Estos resultados mostraron que la isoqueracetina es capaz de inhibir la activación del inflamasoma inducida por SARS-CoV-2 en monocitos humanos CD14<sup>+</sup>.

Luego, nos preguntamos si esta activación del inflamasoma en los monocitos podría modular la función de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Para explorar esta hipótesis, se utilizaron los medios condicionados de cultivo (MCC) obtenidos de monocitos en distintas condiciones experimentales y se emplearon en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR; Del inglés *Mixed Lymphocyte Reaction*). Los resultados mostraron que el MCC derivado de monocitos infectados indujo un aumento en la expresión del receptor co-inhibidor PD-1 en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 13F) en comparación con el MCC de monocitos no infectados. Esto sugiere que la activación del inflamasoma en monocitos infectados *in vitro*, induce la secreción de factores solubles capaces de modular la función de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Si bien la expresión de PD-1 no es exclusiva de los linfocitos T disfuncionales

o exhaustos, esta aumenta en dichas poblaciones celulares y contribuye al proceso de agotamiento <sup>285</sup>. Es de destacar que el MCC de monocitos infectados y tratados con isoqueracetina redujo la expresión de PD-1 en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en comparación con el MCC de monocitos infectados en ausencia de la droga (Figura 13F). Por otro lado, apoyando el escenario de que la expresión de PD-1 es un marcador de agotamiento en nuestro modelo, el bloqueo de PD-1 aumentó de manera significativa la producción de IFN-γ en los linfocitos T CD8+ (Figuras 13G,H). Esto ocurrió en presencia del MCC de monocitos infectados, en comparación con el de monocitos sin infectar.



**Figura 13. Modulación farmacológica del eje inflamasoma/disfunción T inducido por el SARS-CoV2 *in vitro*.**

(A) Estudio de citometría de flujo del transporte de  $\text{Na}^+$  dependiente de TMEM176b en células CHO cargadas con la sonda sensible al  $\text{Na}^+$  Asante NaTRIUM Green-2 (ANG-2). Las células se trataron con isoqueracetina (ISQ) 5  $\mu\text{M}$  o DMSO (control vehículo). Se muestra un experimento representativo de 4. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Two-way ANOVA test. (B) Estudio de la secreción de IL-1 $\beta$  en monocitos humanos infectados con SARS-CoV-2  $\pm$  5  $\mu\text{M}$  ISQ. Mock = no infectado. Se muestra un experimento representativo de tres. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . One-way ANOVA test. (C) Estudio de la carga viral en monocitos humanos infectados con SARS-CoV2  $\pm$  5  $\mu\text{M}$  ISQ. Se muestra un experimento representativo de tres. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . One-way ANOVA test. (D) Estudio del MFI de la sonda FLICA-1 (específica para la Caspasa-1 activa) de un pool de tres experimentos independientes donde los monocitos humanos están no infectados (mock) o infectados con SARS-CoV2 y tratados con DMSO (control vehículo) o 5 $\mu\text{M}$  ISQ. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . One-way ANOVA test. (E) Histogramas representativos de citometría de flujo de los experimentos mostrados en D. Se muestra un experimento representativo de tres. (F) Estudio de la expresión de PD-1 por células CD8+ TCR- $\beta$ + co-cultivadas con monocitos alogénicos  $\pm$  medio de cultivo condicionado (MCC) de monocitos infectados con SARS-CoV2  $\pm$  5 $\mu\text{M}$  ISQ. Se muestra un experimento representativo de tres. (G-H) Estudio de citometría de flujo de la expresión de IFN- $\gamma$  por linfocitos T CD8+ co-cultivados con monocitos alogénicos  $\pm$  MCC de monocitos sin infectar (mock) o infectados con SARS-CoV2  $\pm$  anti-PD-1 o su anticuerpo control (20  $\mu\text{g/mL}$ ). El porcentaje de células IFN- $\gamma$ + se muestra en G y la media de intensidad de fluorescencia (MFI) de células positivas en H. Las gráficas muestran un experimento representativo de tres. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . One-way ANOVA test

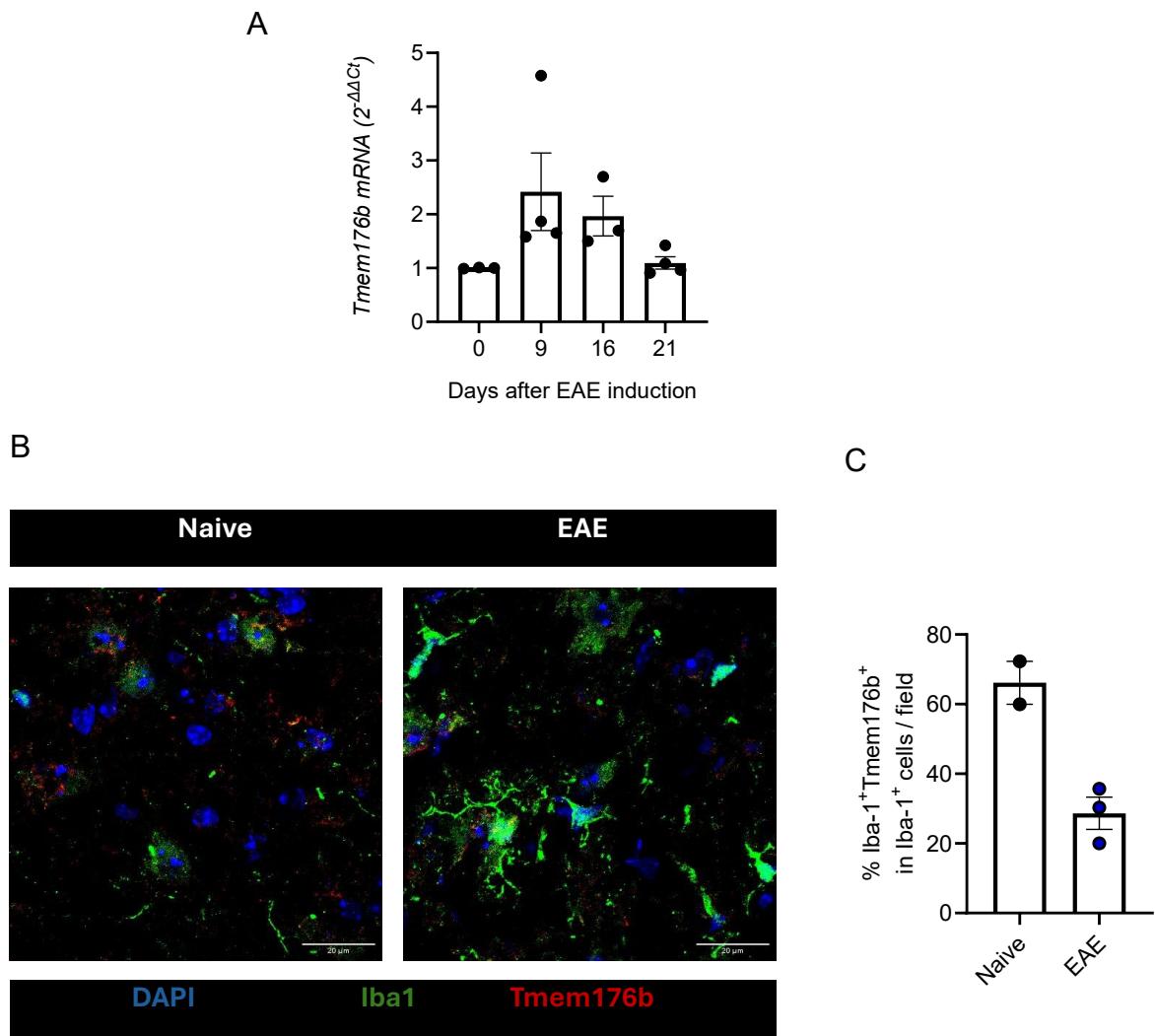
Por tanto, la activación farmacológica de TMEM176B y el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 puede abolir la modulación de linfocitos T inducida por factores solubles producidos por monocitos humanos infectados con SARS-CoV-2. En ese contexto, resultados previos del grupo del Dr. Pedro Moraes mostraban que uno de esos factores podría ser la IL-1 $\beta$ , puesto que su bloqueo controla la modulación de linfocitos T inducida por el MCC de monocitos infectados con SARS-CoV-2<sup>286</sup>. Estos resultados sugieren además que la activación del inflamasoma en monocitos infectados con SARS-CoV-2 tiene el potencial de inducir la disfunción de las células T. En ese contexto, TMEM176B surge como potencial blanco farmacológico para inhibir la activación del inflamasoma en COVID-19 y prevenir la disfunción T. Además, el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 aparece como potencial estrategia terapéutica para modular el agotamiento en el contexto de las infecciones por  $\beta$ -coronavirus.

## 2. TMEM176B protege frente a la encefalomielitis autoinmune y constituye un potencial blanco terapéutico

### 2.1 *Tmem176b* protege de la severidad en la Encefalomielitis Autoinmune Experimental

Para explorar el rol protector de TMEM176B en la autoinmunidad, utilizamos el modelo murino de Esclerosis Múltiple la "Encefalomielitis Autoinmune Experimental" (EAE). Este es el correlato murino más utilizado como modelo pre-clínico para estudiar la EM, ya que reproduce diversos efectos observados en la enfermedad humana, como la inflamación, desmielinización, pérdida axonal, gliosis y presenta una respuesta inmune similar<sup>156</sup>. Además, reproduce el rol patogénico del inflamasoma en la EM, puesto que los ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Casp-1*<sup>-/-</sup> y *Asc*<sup>-/-</sup>, presentan un inicio tardío y una menor gravedad de la EAE<sup>190,191</sup>. Desde un punto de vista cinético, cursa con picos y remisiones pudiendo identificarse distintas etapas: pre-inducción (día 0), pre-clínica (días 1-9), clínica (10-19) y remisión (20-21).

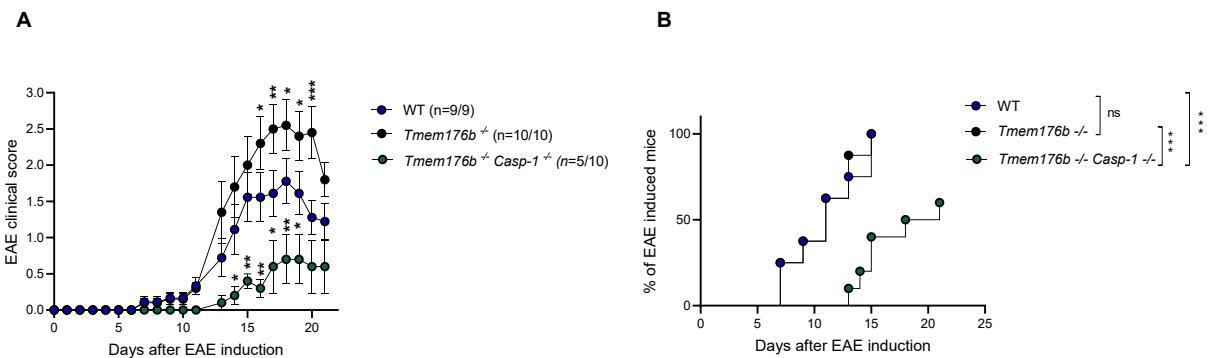
En primer lugar, evaluamos la expresión total de *Tmem176b* en la médula espinal (ME) para las diferentes etapas de la EAE observando que su expresión aumentó en los días 9 y 16 post-inducción, para luego disminuir hacia el día 21 (Figura 14A). De manera más específica, estudios de inmunofluorescencia incluidos en la tesis de grado de Antonella D'Anatro (que se desarrolló bajo mi orientación) mostraron que la expresión de *Tmem176b* disminuía en la microglía de animales con EAE (día 21) al comparar con animales sin inducir (Figura 14B,C).



**Figura 14. Perfil de expresión de *Tmem176b* en la médula espinal y microglía de animales *naive* o con EAE.**

Se indujo la EAE en hembras WT y el día del sacrificio los animales fueron anestesiados profundamente y se extrajo la médula espinal. (A) Los animales fueron sacrificados a los días indicados post-inducción y se realizó RT-qPCR para la expresión de *Tmem176b* en la médula espinal. Se reporta el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  relativo a la expresión de *Gapdh*. (B) Inmunofluorescencia de *Tmem176b* e *Iba1* en la región del cuerno ventral en la médula de ratones *naive* y con EAE. Imágenes representativas de cada grupo con los marcadores DAPI (azul), *Iba1* (verde) y *Tmem176b* (rojo). El análisis se realizó mediante microscopía confocal (Zeiss 880) y procesamiento posterior en ImageJ. (C) Se muestra el análisis cuantitativo del porcentaje de células  $Tmem176b^+ Iba1^+$  sobre el total de las células microgliales (*Iba1*<sup>+</sup>) de animales *naive* o con EAE por campo, para un promedio de  $n=10$  campos por animal.

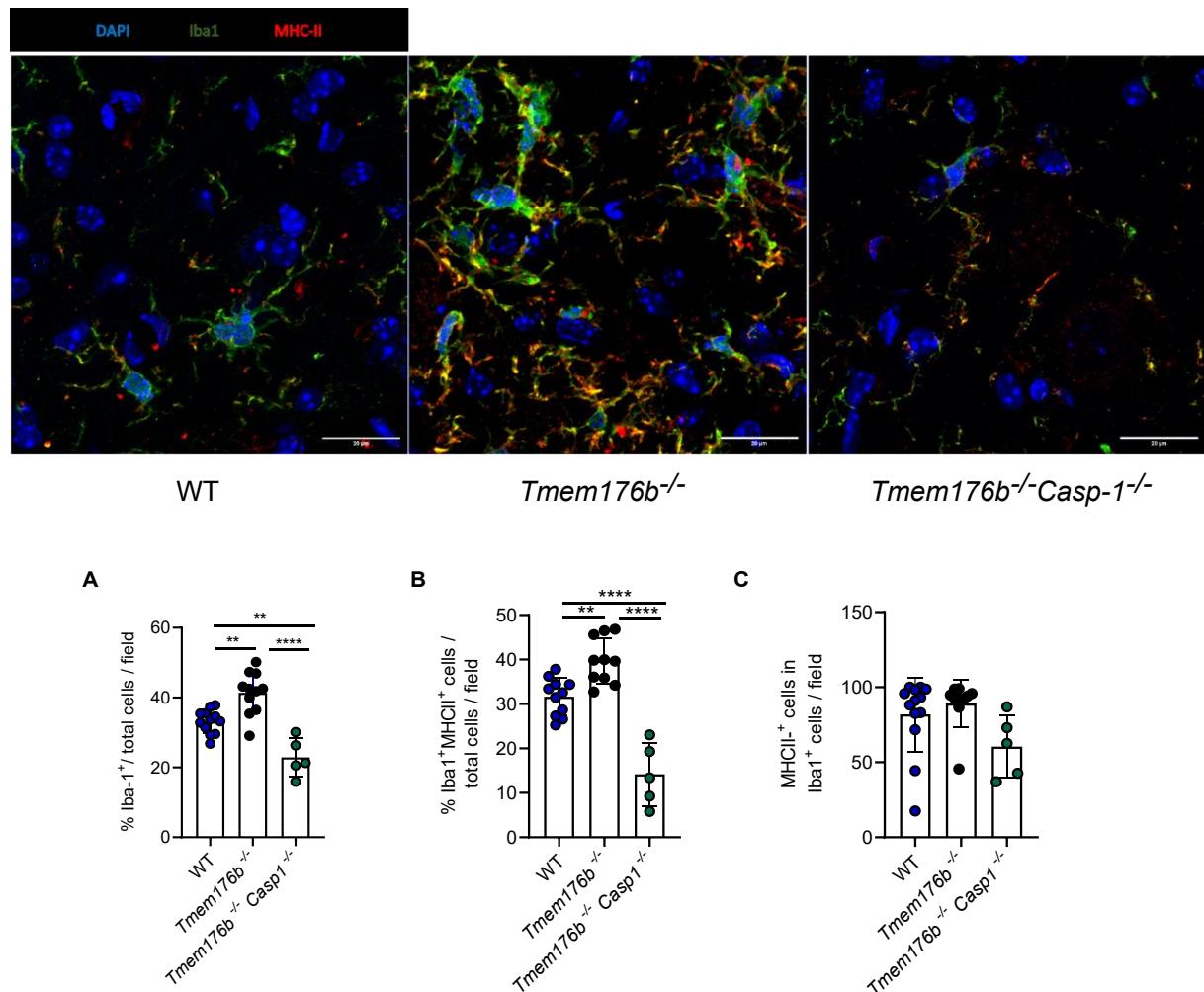
Al analizar la incidencia de la enfermedad, encontramos una similitud entre los animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (Figura 15B). En cambio, los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Caspasa-1*<sup>-/-</sup> mostraron una menor incidencia y un retraso en el inicio clínico, posiblemente atribuibles a la delección de Caspasa-1 (Figura 15B)<sup>190,191</sup>. Por otro lado, los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> desarrollaron una forma más severa de la EAE, con un aumento del score clínico que fue estadísticamente significativo entre los días 16-20 post-inducción al comparar con los WT (Figura 15A). Este incremento no se observó en los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Caspasa-1*<sup>-/-</sup>, lo que podría deberse a un efecto independiente de la delección de Caspasa-1 o, alternativamente, a que la mayor severidad observada en ausencia de *Tmem176b* sea mediada por el inflamasoma



**Figura 15. Respuesta a la encefalomielitis autoinmune (EAE) en ratones WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Caspase-1*<sup>-/-</sup>.** Se inmunizaron hembras entre 9-13 semanas C57BL/6 con 200 µg de péptido MOG-35-55 emulsificado en Adyuvante Completo de Freund (CFA) y se monitorearon diariamente. (A) Se indica el score clínico para ratones WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> o *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Casp-1*<sup>-/-</sup>. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del grupo WT. p-valor ajustado: (\*) p < 0.05 (\*\*) p < 0.01 (\*\*\* p < 0.001 Two-way RM ANOVA - con corrección de Bonferroni para múltiple comparación aplicado al score clínico día a día. (B) Se muestran las curvas de incidencia de la EAE para los grupos WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> o *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Casp-1*<sup>-/-</sup>. (\*\*\*\*) p < 0.001 Log-Rank Mantel-Cox test.

En acuerdo con las diferencias observadas para la severidad, estudios de microscopía confocal realizados junto con Antonella mostraron un aumento en la microgliosis en la médula espinal (ME) de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> a día 21 post-inducción (Figura 16A), en comparación con el grupo WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Caspase-1*<sup>-/-</sup>, un parámetro indicativo de neuroinflamación<sup>287</sup>. Asimismo, se detectó un aumento en el número de células microgliales activadas (Iba-1<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>) en el grupo *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (Figura 16B) donde la mayor parte de las células microgliales expresaron MHC-II (Figura 16C). Además, en el día 21 post-inducción, detectamos

una mayor desmielinización en la ME de animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> al comparar con los WT (Figura 17). En ese mismo contexto, estudios hematológicos mostraron un aumento – aunque estadísticamente no significativo ( $p=0.076$ ) – en la relación Neutrófilos/Linfocitos en los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> a día 15 post-inducción (etapa clínica) frente a animales WT (Figura 18B). Este índice suele ser más alto en pacientes con EM en comparación con controles sanos y se asocia con la actividad de la enfermedad<sup>288</sup>. En acuerdo, no se observó esta diferencia entre el grupo WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> en animales en la etapa pre-clínica (día 8) o en remisión de la enfermedad (día 21) (Figura 18A, C).



**Figura 16. La ausencia de *Tmem176b* se asocia con un aumento de la microglia en la médula espinal.**

Se indujo la EAE en hembras WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. Los animales fueron sacrificados mediante anestesia profunda y perfusión transcardíaca con paraformaldehído (PFA) 4% (v/v) en PBS pH=7.4. Las médulas espinales fijadas con PFA fueron extraídas, inmersas en OCT® y cortadas en secciones de 10  $\mu$ m. Luego, fueron teñidas con el anticuerpo Iba-1 (verde) para detectar la microglía y MHC-II (rojo) para evaluar el nivel de activación y DAPI (azul) para visualizar los núcleos. En el panel superior se muestran imágenes representativas de microscopía confocal (10x). En el panel inferior, se muestra el análisis cuantitativo del porcentaje de Iba1<sup>+</sup>/células totales/campo (A) MHC-II<sup>+</sup> Iba1<sup>+</sup>/células totales/campo (B) MHC-II<sup>+</sup> Iba1<sup>+</sup> / células Iba1<sup>+</sup> /campo (C). n=10 campos/animal. Los datos se expresan como Promedio $\pm$ SEM y se analizaron por One-Way ANOVA multiple comparisons. \*\*p < 0.01 \*\*\*\*p < 0.0001

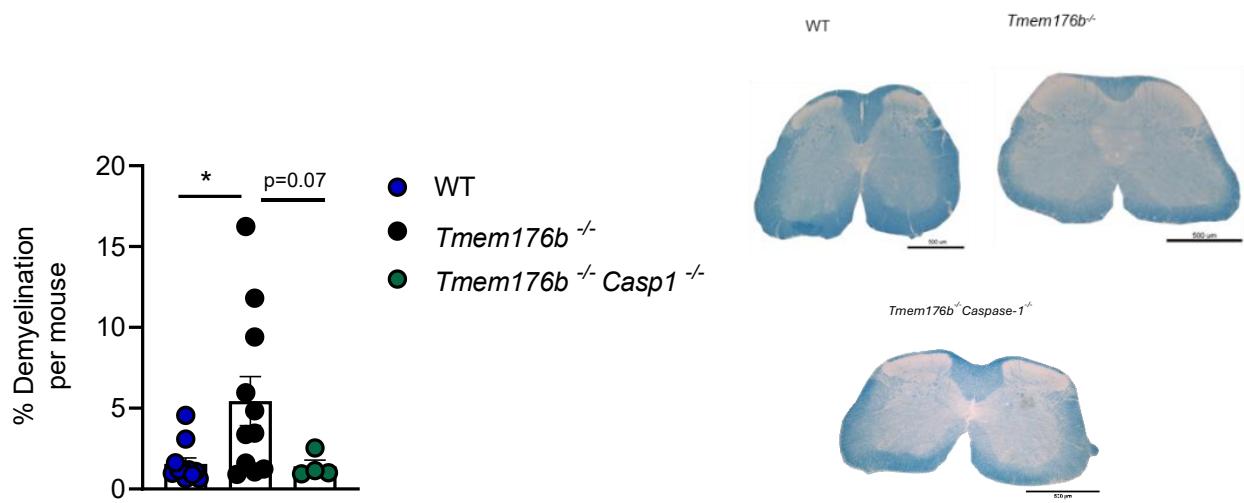


Figura 17. Cuantificación de la mielina en ratones WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Caspase-1*<sup>-/-</sup> con EAE.

Se indujo la EAE en hembras WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. Los animales fueron sacrificados mediante anestesia profunda y perfusión transcardíaca con paraformaldehido (PFA) 4% (v/v) en PBS pH=7.4. Las médulas espinales fijadas con PFA fueron extraídas, inmersas en OCT® y cortadas en secciones de 10  $\mu$ m. Luego, fueron teñidas con Luxol Fast Blue (LFB) y se analizó la cantidad de mielina (marcada con LFB) mediante ImageJ. Se muestra el análisis cuantitativo del porcentaje de desmielinización normalizado por el área total de la médula e imágenes representativas de la médula espinal de animales WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Caspase-1*<sup>-/-</sup> (panel derecho). *Mann-Whitney Test* \*p < 0.05

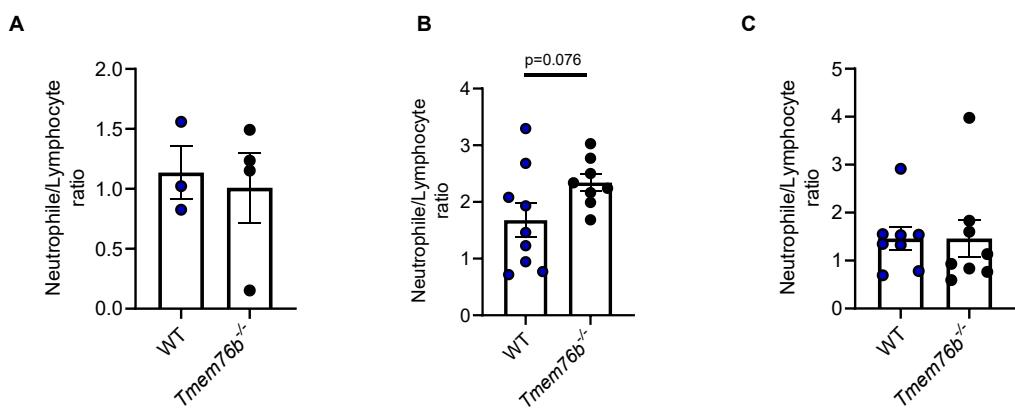
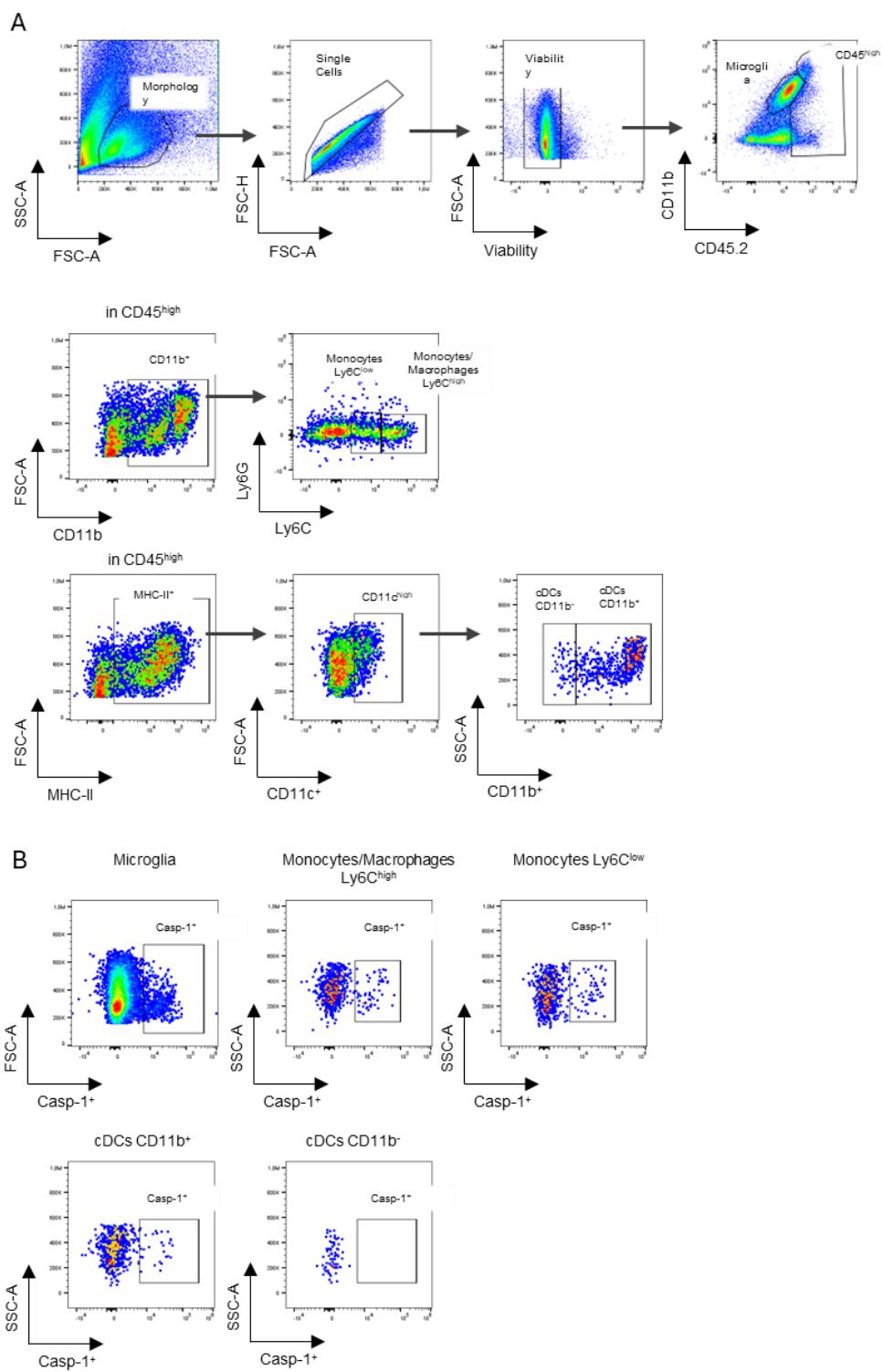


Figura 18. Análisis hematológico del índice Neutrófilos/Linfocitos en ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> con EAE.

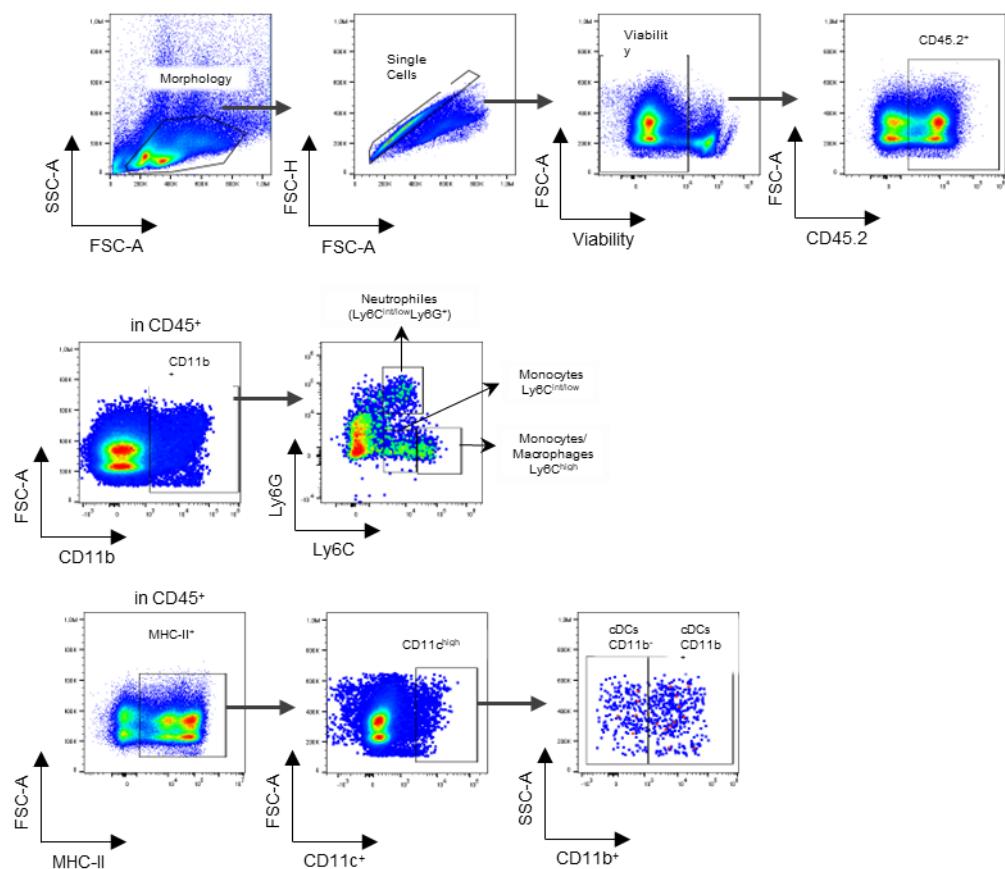
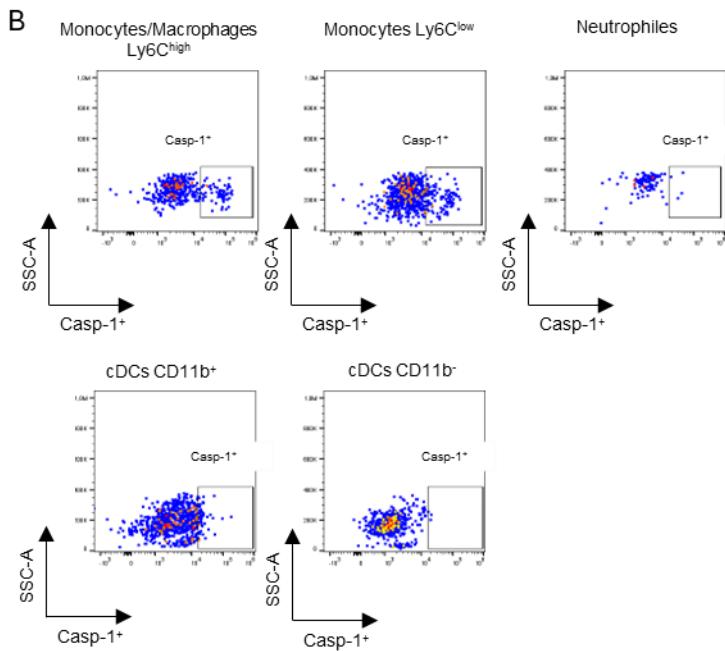
Se indujo la EAE en hembras WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> y se realizaron extracciones de sangre de ratones en la etapa pre-clínica (día 8) (A), clínica (día 15) (B) y en remisión (día 21) (C). La sangre se analizó con el contador hematológico Mindray BC500Vet. Y se evaluó el índice (ratio) Neutrófilos/Linfocitos. *t-test no pareado*. \*p < 0.05

Puesto que el rol inhibidor de Tmem176b sobre el inflamasoma podría explicar su efecto protector en la EAE, procedimos a estudiar la activación de la Caspasa-1 en la microglía y células del compartimento mieloide mediante análisis por citometría de flujo. Esto fue evaluado tanto en la ME como en los ganglios drenantes (*dLN*s) del sitio de inmunización siguiendo la estrategia de definición de poblaciones celulares representada en las Figuras 19 y 20. Resulta pertinente aclarar que si bien en estas figuras se muestra el estudio de la Caspasa-1 en los neutrófilos, la presencia de esta población fue variable y tuvo una activación nula o muy baja de Caspasa-1 por lo que fueron excluidos de la cuantificación posterior.



**Figura 19. Estrategia de análisis para el estudio por citometría de flujo de la activación Caspasa-1 en poblaciones mieloides de la médula espinal.**

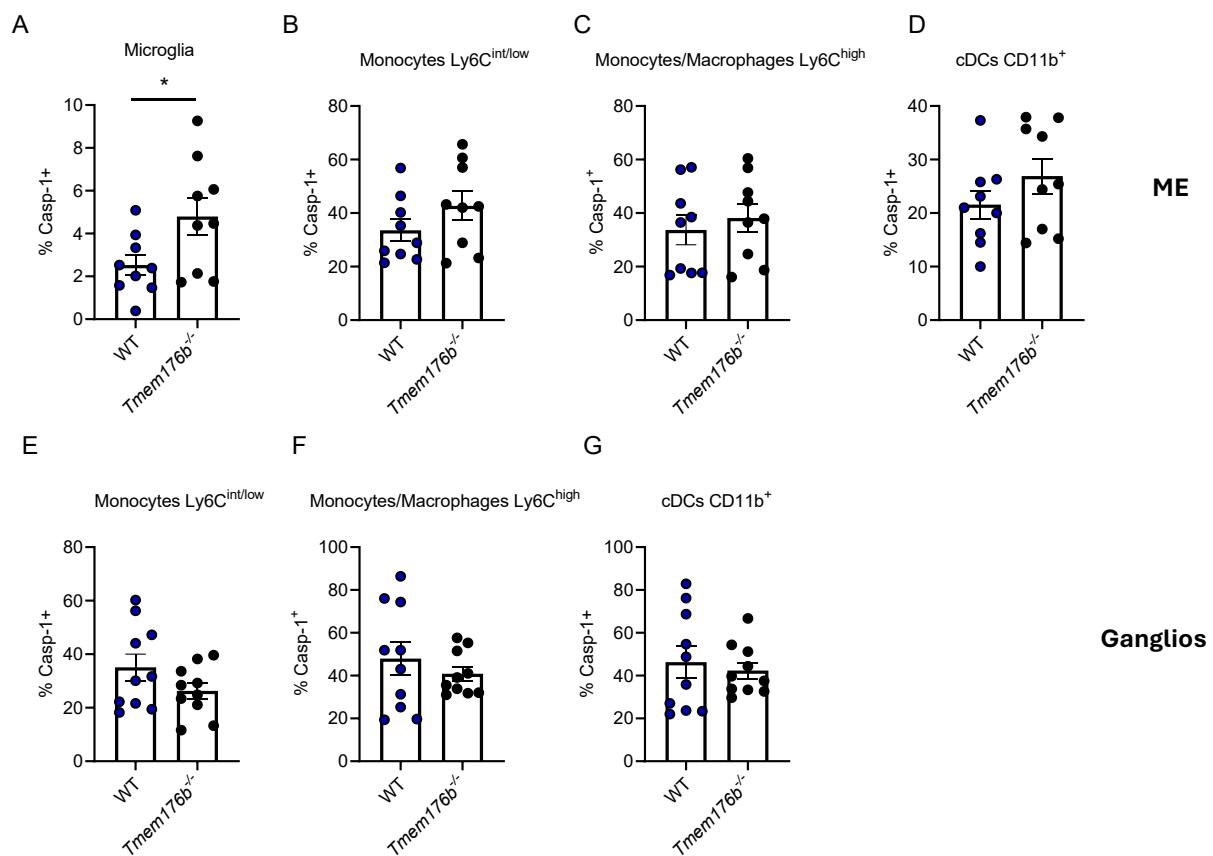
(A) Se muestran *dot-plots* representativos para la estrategia empleada para identificar las distintas poblaciones mieloides en la médula espinal. (B) *Dot-plots* representativos para el análisis de activación de la Caspasa-1 (Casp-1) en las distintas poblaciones mieloides de la médula espinal.

**A****B**

**Figura 20. Estrategia de análisis para el estudio por citometría de flujo de la activación de Caspasa-1 en poblaciones mieloides de los ganglios drenantes al sitio de inmunización.**

(A) Se muestran dot-plots representativos para la estrategia empleada para identificar las distintas poblaciones mieloides en los ganglios inguinales, drenantes al sitio de inmunización. (B) Dot-plots representativos para el análisis de activación de la Caspasa-1 (Casp-1) en las distintas poblaciones mieloides de los ganglios inguinales.

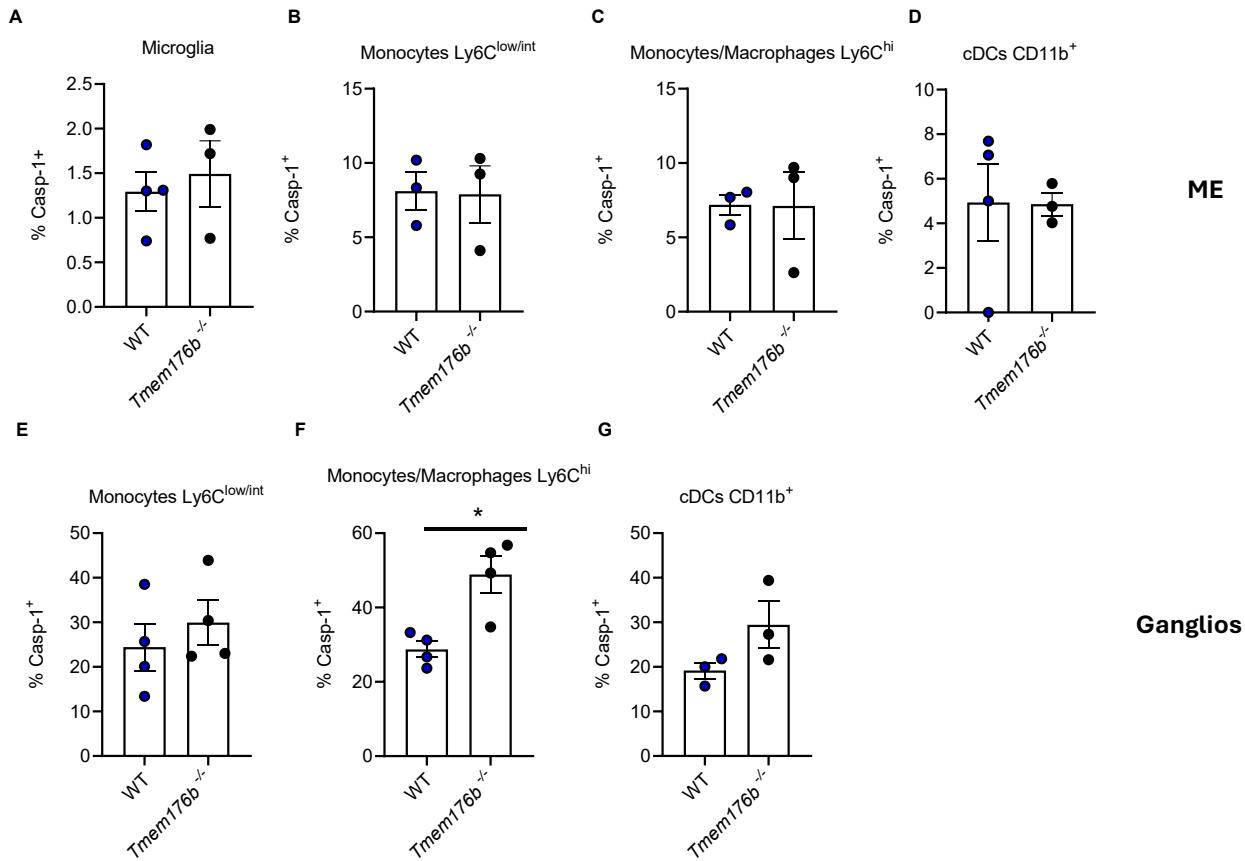
Estos análisis mostraron que en la etapa clínica (día 15) la microglía mostró un aumento significativo en la activación de Caspasa-1 en la ME de ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> en comparación con los WT (Figura 21A). Curiosamente, esta tendencia no se observó para otras poblaciones mieloides relevantes en la activación del inflamasoma como monocitos/macrófagos Ly6C<sup>high</sup>, monocitos Ly6C<sup>low</sup> y cDCs CD11b<sup>+</sup>, en la ME o en los ganglios en esta misma etapa de la enfermedad (Figura 21B-G).



**Figura 21.** Análisis por citometría de flujo de la activación de la Caspasa-1 en poblaciones relevantes para la activación del inflamasoma para la etapa clínica de la EAE.

Se indujo la EAE en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. A día 15 post-inducción, se sacrificaron los animales mediante anestesia profunda y se realizó perfusión transcardíaca con HBSS. Se extrajo la médula espinal (A-D) y se separó la fracción celular de la mielina mediante gradiente de percoll al 30%. Además, se extrajeron los ganglios inguinales drenantes al sitio de inmunización (E-F). Las células se marcaron con anticuerpos o la sonda FLICA (específica para la Caspasa-1 activa) para su análisis por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células FLICA<sup>+</sup> (Caspase-1<sup>+</sup>) dentro de la microglía (CD45<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>) (A), monocitos Ly6C<sup>low</sup> (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup>) (B, E), monocitos/macrófagos Ly6C<sup>high</sup> (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup>) (C, F) y células dendríticas convencionales (cDCs) CD11b<sup>+</sup> (CD11b<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup>) (D, G). Unpaired Mann-Whitney t-test.  $p < 0.05$

Buscando analizar los efectos dependientes del inflamasoma en la población mieloide, especulamos que estos podrían ser más evidentes durante el pico de la EAE (día 18 en nuestro modelo, Figura 15). A pesar de que en este punto no observamos diferencias para la activación de la Caspasa-1 en la microglía o el infiltrado mieloide en la ME (Figura 22A-D), detectamos que en los dLN, los monocitos/macrófagos inflamatorios ( $CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^{high}$ ), de ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mostraron una mayor activación de la Caspasa-1 (Figura 22F). Además, las células cDCs  $CD11b^+$  mostraron una tendencia en el mismo sentido (Figura 22G). En su conjunto, estos resultados apoyan un rol protector para *Tmem176b* en la EAE dado por su rol inhibidor del inflamasoma.



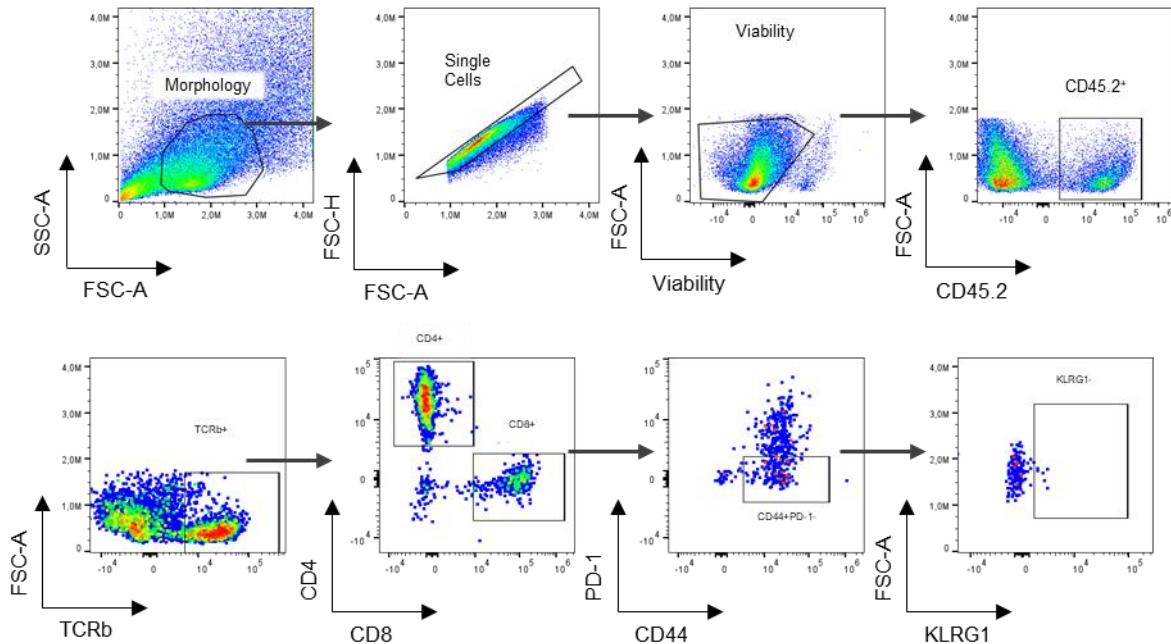
**Figura 22. Análisis por citometría de flujo de la activación de la Caspasa-1 en poblaciones relevantes para la activación del inflamasoma en el pico de la EAE.**

Se indujo la EAE en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. A día 18 post-inducción, se sacrificaron los animales mediante antestesia profunda y se realizó perfusión transcardíaca con HBSS. Se extrajo la médula espinal (A-D) y se separó la fracción celular de la mielina mediante gradiante de percoll al 30%. Además se extrajeron los ganglios inguinales drenantes al sitio de inmunización (E-F). Las células se marcaron con anticuerpos o la sonda FLICA (específica para la Caspasa-1 activa) para su análisis por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células FLICA<sup>+</sup> (Casp-1<sup>+</sup>) dentro de la microglía (CD45<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>) (A), monocitos Ly6C<sup>low</sup> (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup>) (B,E), monocitos/macrófagos Ly6C<sup>high</sup> (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup>) (C,F) y células dendríticas convencionales (cDCs) CD11b<sup>+</sup> (CD11b<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup>) (D,G). *Unpaired Mann-Whitney t-test.* \*p<0.05

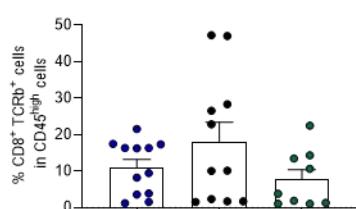
## 2.2 La delección de *Tmem176b* se asoció con el agotamiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y la modulación de células Th17

Como fue descrito en los antecedentes y en la primera parte de esta tesis, TMEM176B es capaz de modular la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> en contextos anti-tumorales y anti-virales<sup>52,289</sup>. Con estos antecedentes, y con el objetivo de profundizar en los mecanismos protectores de *Tmem176b* en el contexto de la EAE, procedimos a estudiar el comportamiento de células T. Inicialmente, no se encontraron diferencias a nivel del porcentaje o número de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> totalmente, ni en la activación de estas células en animales WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> o *Tmem176b*<sup>-/-</sup>-*Caspasa-1*<sup>-/-</sup> (Figura 23).

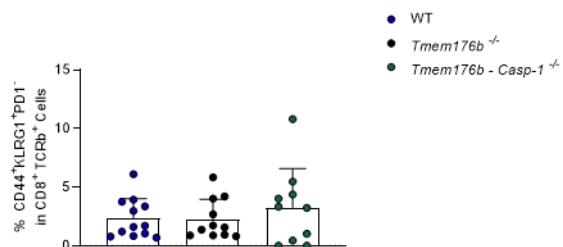
A



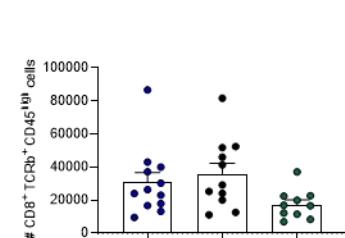
B



C



D



E

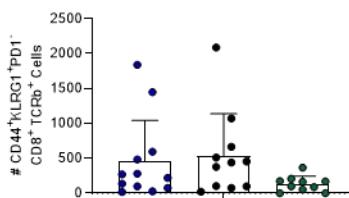
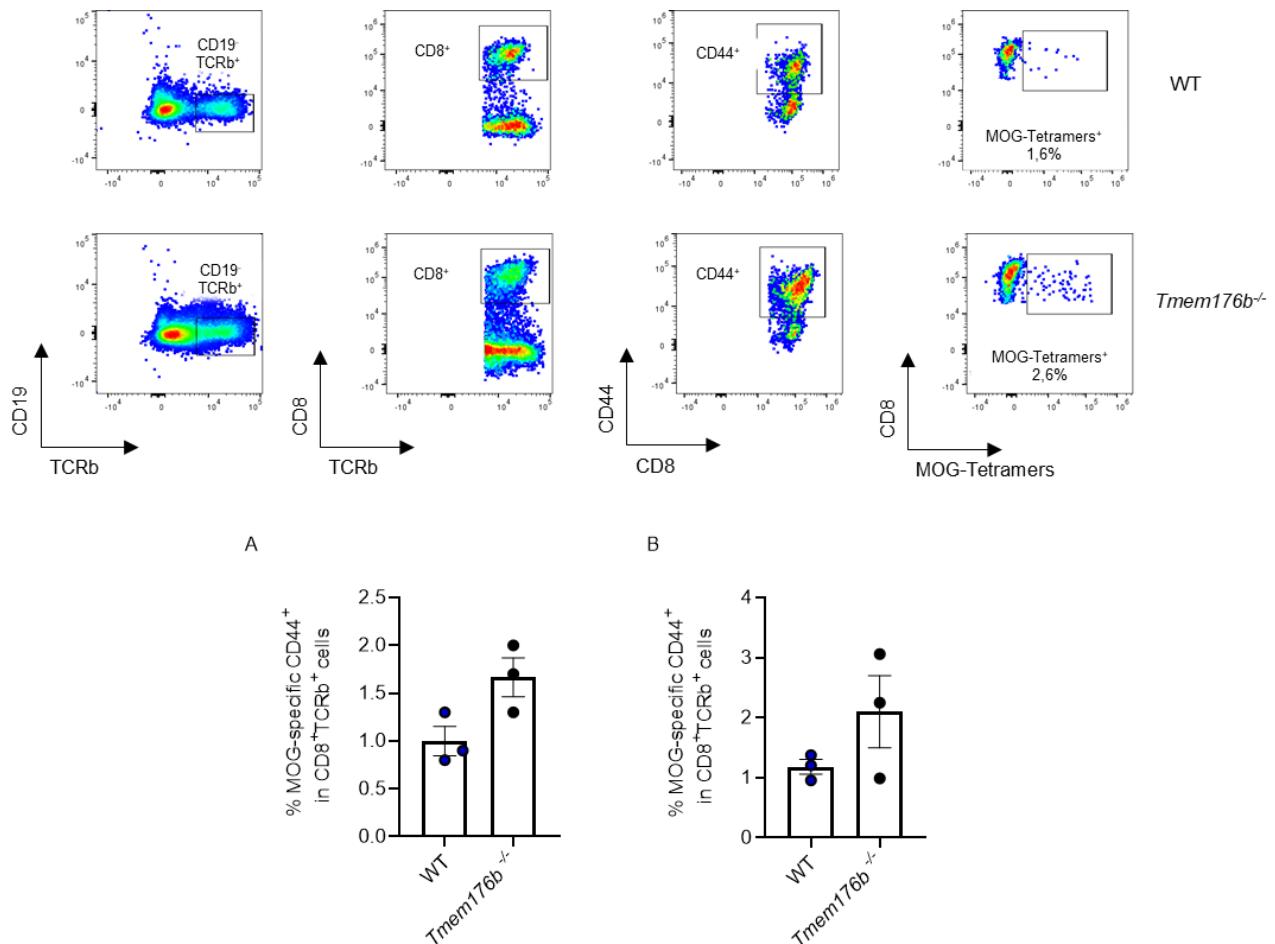


Figura 23. Análisis de citometría de flujo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la médula espinal de animales con EAE.

Se indujo la EAE en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. El día del sacrificio, los animales fueron sacrificados mediante anestesia profunda y perfusión transcardíaca con HBSS. Se extrajo la médula espinal y se separó la fracción celular de la mielina mediante gradiente de percoll al 30%. Las células se marcaron con anticuerpos para su análisis por citometría de flujo. Se muestran la estrategia de gating (A) para la identificación del porcentaje (B) y número absoluto (D) de linfocitos T CD8+, así como el porcentaje (C) y número absoluto (E) de linfocitos T CD8+ efectores (CD44<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>KLRG1<sup>+</sup>). Tukey's multiple comparisons test  $p < 0.05$ .

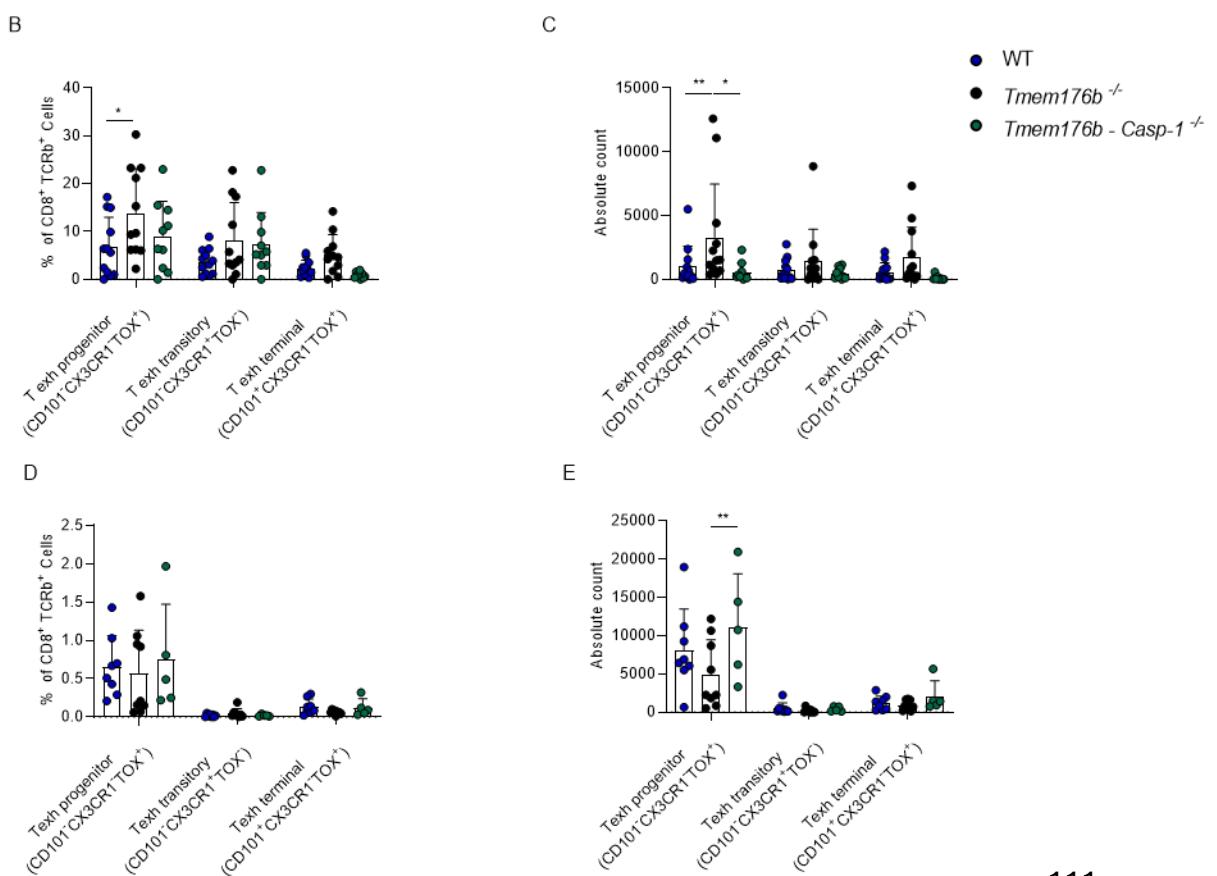
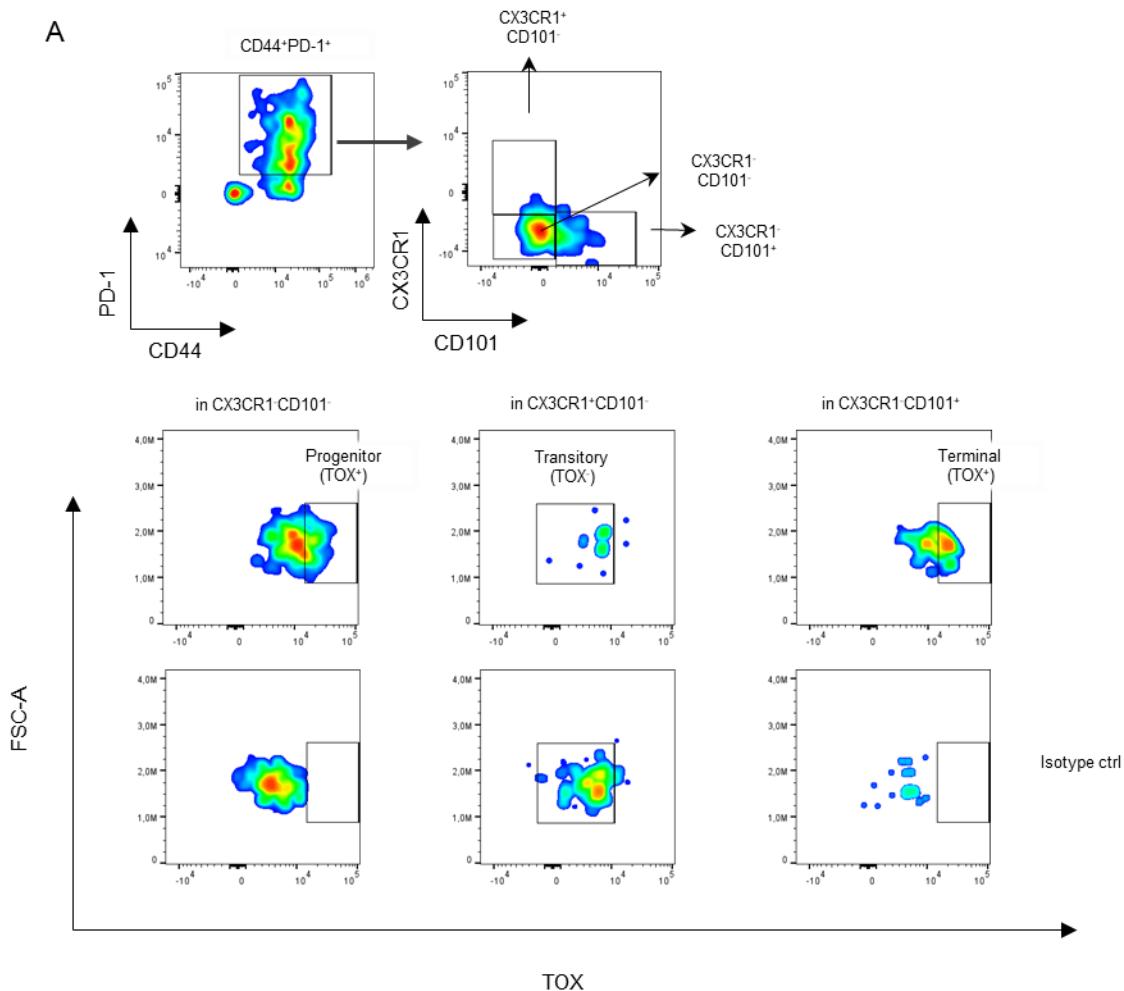
En un análisis más detallado del compartimento T CD8<sup>+</sup> estudiamos las células T CD8<sup>+</sup> autorreactivas activadas en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> versus WT tanto en la ME como en los ganglios drenantes (Figura 24). Este abordaje reveló mayores porcentajes de células T CD8<sup>+</sup> autorreactivas activadas en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> versus WT en ambos sitios (Figura 24A,B). Sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística, muy probablemente debido al bajo número de animales analizados. Cabe señalar que, mientras se redacta esta tesis, se están realizando experimentos adicionales para incrementar el tamaño muestral y confirmar estas observaciones.

A partir de los hallazgos de la primera parte de esta tesis en la infección viral, decidimos explorar en el modelo de EAE el estado de agotamiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Nuestros resultados mostraron un aumento en la sub-población T exhausta progenitora (Tpex) en la ME de ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> respecto a los grupos WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> (Figura 25B,C). Es de destacar que, en los ganglios drenantes del sitio de inmunización, se observó un patrón inverso, con una disminución en el número absoluto de estas subpoblaciones, lo que podría reflejar su migración desde el ganglio hacia la médula espinal (Figura 25D,E). Las células Tpex poseen capacidad de autorrenovación, dan lugar a las otras sub-poblaciones de exhaustas y podrían mediar la severidad al promover la persistencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreactivos<sup>290,291</sup>. En ese espíritu decidimos estudiar si las distintas subpoblaciones de exhaustas se relacionaban de alguna forma con la severidad de la enfermedad. En acuerdo, hallamos una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la severidad y la presencia de células T exhaustas transitorias en *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, que no se observó en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> (Figura 26).



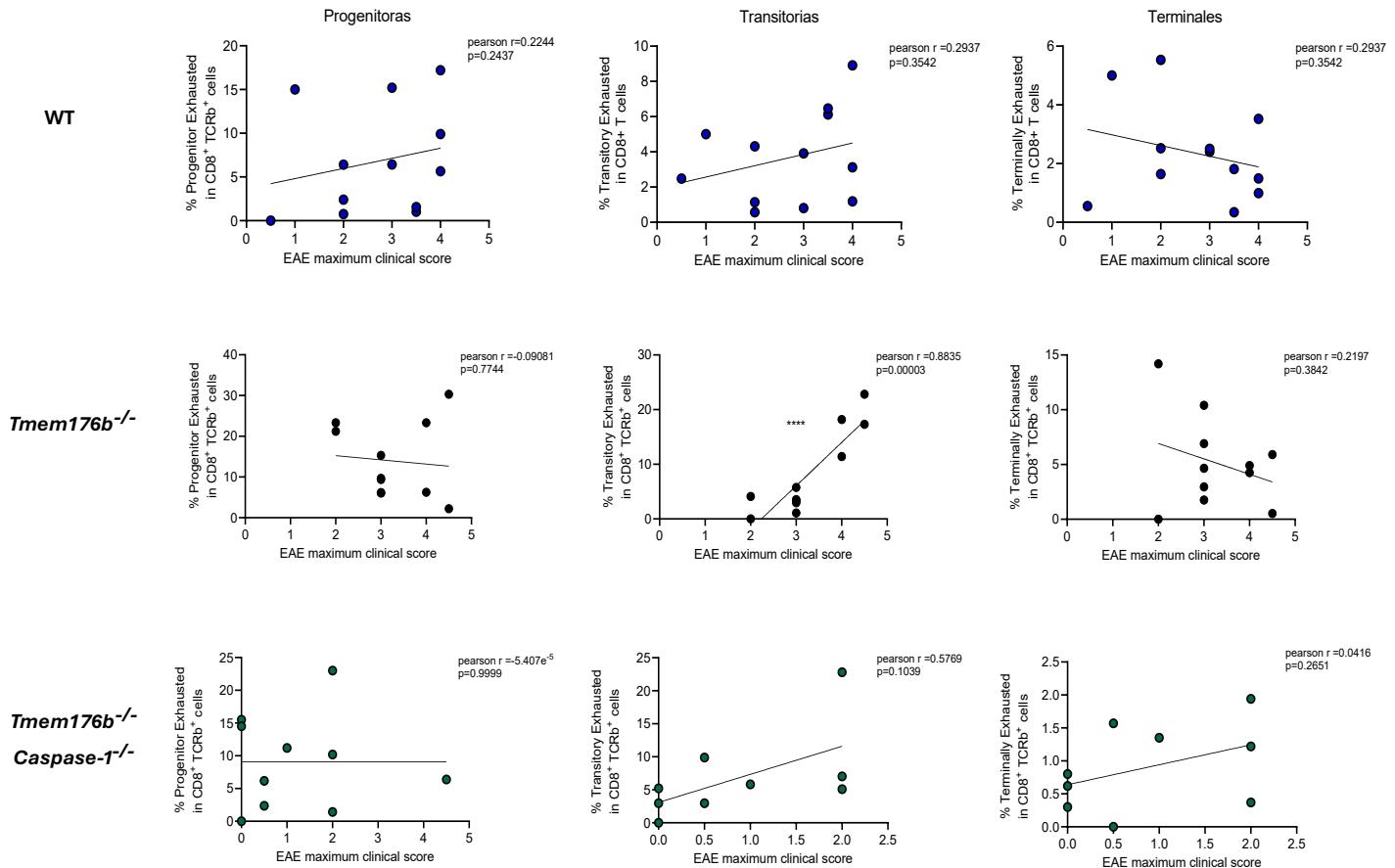
**Figura 24. Análisis de Citometría de flujo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreactivos en la médula espinal y los ganglios de animales con EAE.**

Se indujo la EAE en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. Los animales fueron sacrificados mediante anestesia profunda y perfusión transcardíaca con HBSS. Se extrajo la médula espinal y los ganglios inguinales que drenan al sitio de inmunización. Las células se marcaron con anticuerpos y tetrámeros con el péptido MOG 37-50 para su análisis por citometría de flujo. Panel superior: Dot-plots representativos para el análisis de las células T CD8<sup>+</sup> autorreactivas en la médula espinal y ganglios de animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> con EAE. Panel inferior: Se muestran el porcentaje de células específicas para la proteína MOG de la mielina, CD44<sup>+</sup>, dentro del total de células T CD8<sup>+</sup> en la médula espinal (A) o los ganglios drenantes (B). Unpaired Mann-Whitney test \*p < 0.05



**Figura 25. Análisis de Citometría de flujo del agotamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la médula espinal y ganglios drenantes de animales con EAE.**

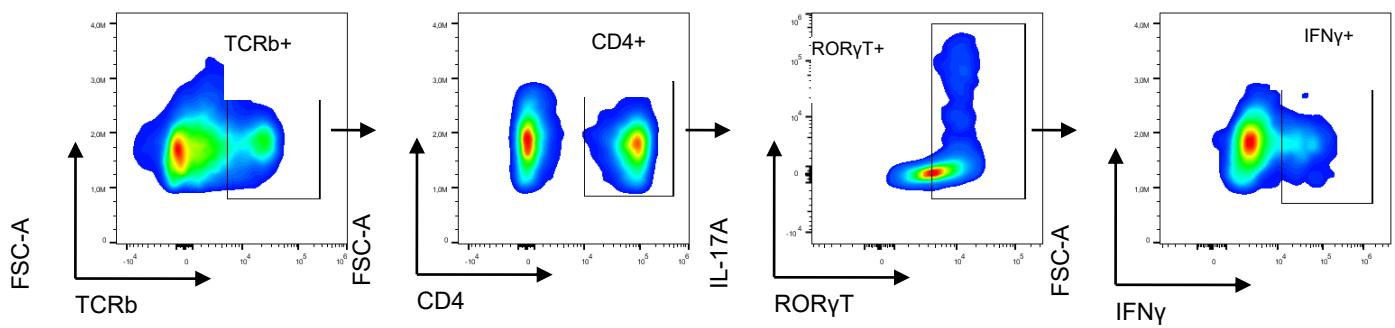
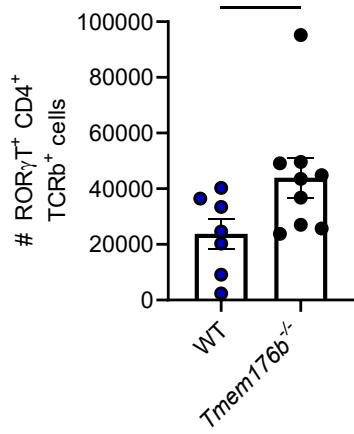
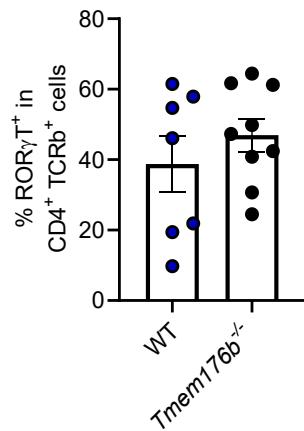
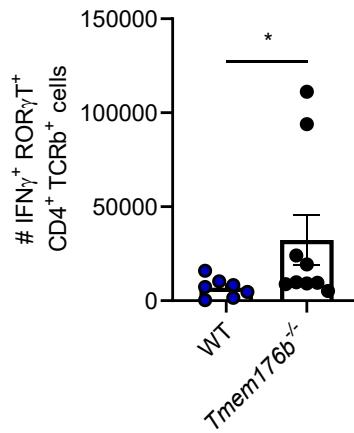
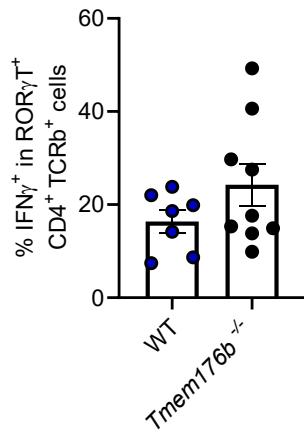
Se indujo la EAE en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. El día del sacrificio los animales fueron sacrificados mediante anestesia profunda y perfusión transcardíaca con HBSS. Se extrajo la médula espinal (B-C) y los ganglios inguinales drenantes al sitio de inmunización (D-E). Las células se marcaron con anticuerpos para su análisis por citometría de flujo. (A) Se muestran dot-plots representativos para la estrategia de *gating* utilizada para identificar el porcentaje (B,D) y número absoluto (C,E) de las poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> exhaustos progenitores (CD44<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>TOX<sup>+</sup>CD101<sup>-</sup>CX3CR1<sup>-</sup>), transitorios (CD44<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>TOX<sup>+</sup>CD101<sup>-</sup>CX3CR1<sup>+</sup>) y terminales (CD44<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>TOX<sup>+</sup>CD101<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup>). Tukey's multiple comparisons test \*p<0.05, \*\*p<0.01



**Figura 26. Estudio de correlación para la presencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> exhaustos y la severidad de la EAE.**

Se muestra el estudio de correlación para el porcentaje de distintas sub-poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> exhaustos: progenitores (CD44<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>TOX<sup>+</sup>CD101<sup>-</sup>CX3CR1<sup>-</sup>), transitorios (CD44<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>TOX<sup>+</sup>CD101<sup>-</sup>CX3CR1<sup>+</sup>) y terminales (CD44<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>TOX<sup>+</sup>CD101<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup>) frente al score clínico máximo de la EAE para cada animal para los grupos WT (superior), *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (medio) y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> *Caspase-1*<sup>-/-</sup> (inferior). Pearson's Correlation study. \*\*\*\*p<0.0001.

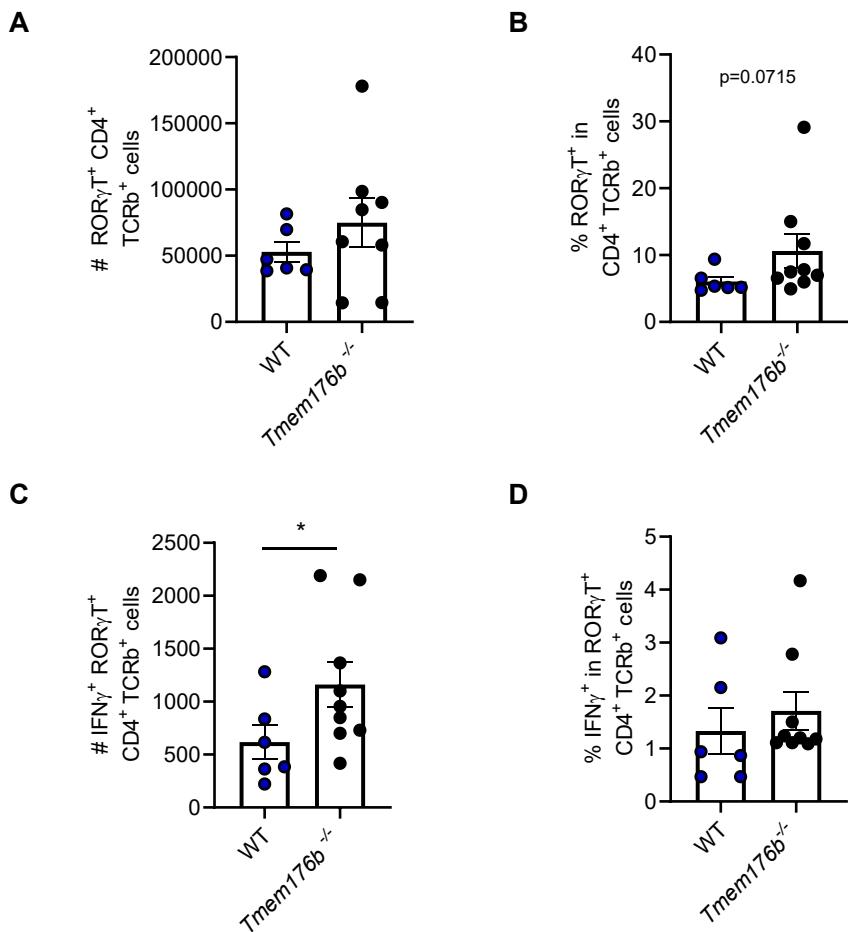
Las células Th17 constituyen otra población inmune adaptativa con un rol preponderante en la patogenia de la EAE<sup>156</sup>. Por esta razón y sumado al hecho de que en modelos murinos de cáncer<sup>52</sup>, se observó que esta población aumenta en ausencia de *Tmem176b*, decidimos analizarla en nuestro modelo. Nuestros resultados mostraron que en la ME (día 21 p.i.) hay un mayor número de estas células en los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> en comparación con el grupo WT (Figura 27B), a pesar de no encontrar diferencias en la proporción relativa de células Th17 dentro del total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 27C). En este contexto, la plasticidad de las células Th17 tiene especial relevancia ya que el entorno citoquímico puede mediar su polarización hacia perfiles efectores o reguladores<sup>99</sup>. En ese sentido, detectamos un incremento en la cantidad de células Th17 de fenotipo patogénico (IFN-γ<sup>+</sup>) en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, junto con un mayor porcentaje relativo (no significativo) de estas células dentro de la población Th17 frente al grupo WT (Figura 27D, E).

**A****B****C****D****E**

**Figura 27. Tmem176b modula la población de células Th17 en la médula espinal de animales con EAE.**

Se indujo la EAE en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. El día del sacrificio, los animales fueron anestesiados profundamente y se realizó perfusión transcardíaca con HBSS 1X. Se extrajo la médula espinal y se separó la fracción celular de la mielina mediante gradiante de percoll al 30%. Las células se marcaron con anticuerpos para su análisis por citometría de flujo. En (A) se muestra un dot plot representativo de la estrategia de análisis realizado dentro de la exclusión por singuletes, viabilidad y morfología. Se muestra el número absoluto (B) de células Th17 (ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> TCRb<sup>+</sup>) y el porcentaje (C) dentro de la población T CD4<sup>+</sup>. En (D) se indica el conteo absoluto de células Th17-IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y en (E) el porcentaje de células IFN $\gamma$ <sup>+</sup> dentro de la población Th17. \*p<0.05 Unpaired Mann-Whitney test.

A su vez, al examinar los ganglios drenantes al sitio de inmunización, se encontró un mayor porcentaje (no significativo) de células Th17 dentro de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del grupo *Tmem176b*<sup>-/-</sup> frente al WT (Figura 28B), sin diferencias en su número absoluto (Figura 28A). Además, se detectó un aumento significativo en el número absoluto de células Th17-IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, sin cambios en su proporción relativa dentro del compartimento Th17 (Figura 28C, D).



**Figura 28. *Tmem176b* modula la población de células Th17 en los ganglios drenantes al sitio de inducción de animales con EAE.**

Se indujo la EAE en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. El día del sacrificio, los animales fueron anestesiados profundamente y se realizó perfusión transcardíaca con HBSS 1X. Se extrajo la médula espinal y se separó la fracción celular de la mielina mediante gradiente de percoll al 30%. Las células se marcaron con anticuerpos para su análisis por citometría de flujo. Se muestra el número absoluto (A) de células Th17 (ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> TCRb<sup>+</sup>) y el porcentaje (B) dentro de la población T CD4<sup>+</sup>. En (C) se indica el conteo absoluto de células Th17-IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y en (D) el porcentaje de células IFN $\gamma$ <sup>+</sup> dentro de la población Th17. \*p<0.05 Unpaired Mann-Whitney test.

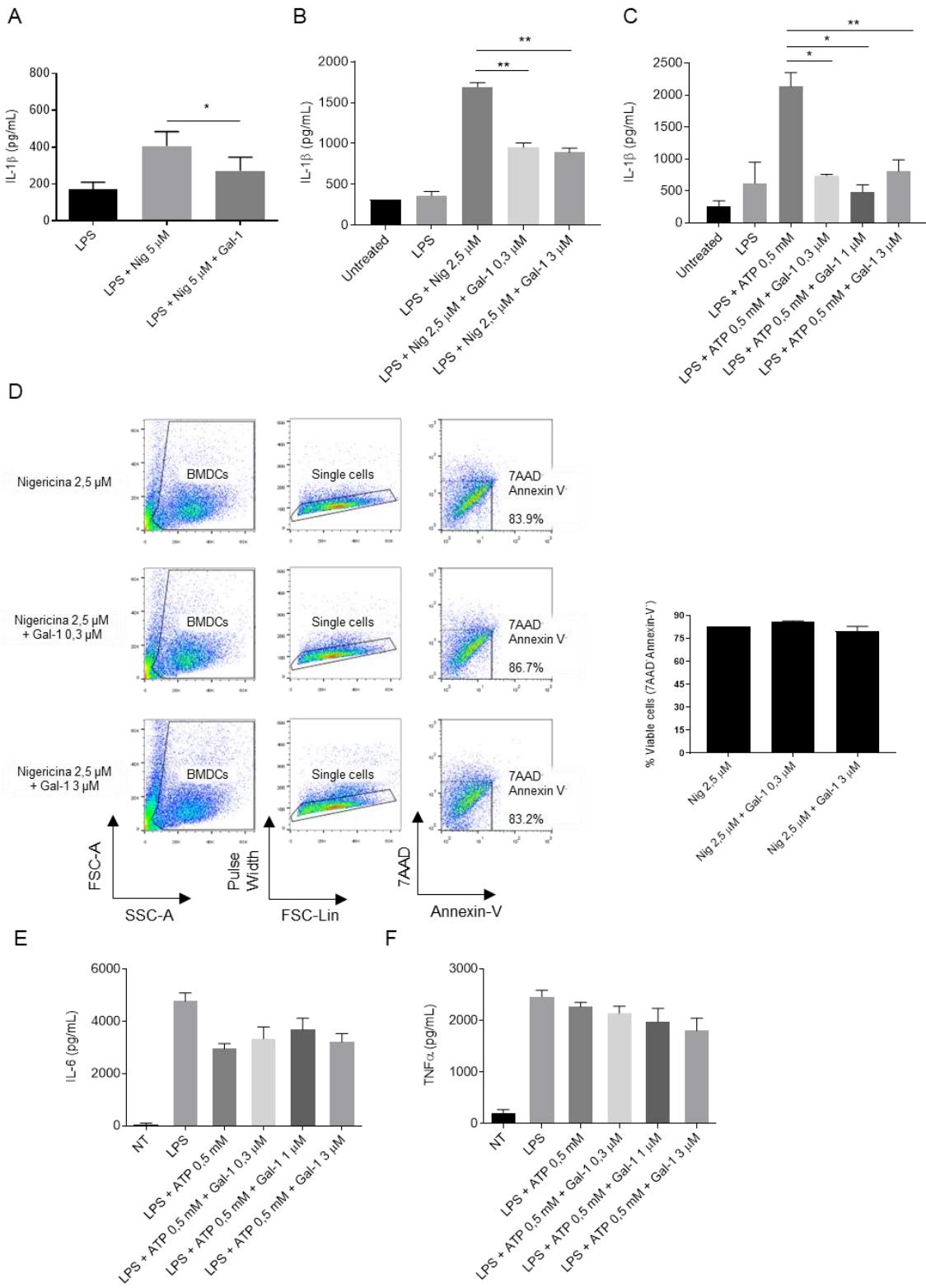
En conjunto, estos hallazgos apoyan el hecho de que Tmem176b impacta en el compartimento de células T, particularmente en el agotamiento de los linfocitos T CD8+ y en la regulación/generación de células Th17 de carácter patogénico. Estas observaciones deberán ser confirmadas mediante evidencias directas, las cuales se discutirán más adelante en la sección de Discusión y Perspectivas de este manuscrito. Por otro lado, el conjunto de resultados presentados hasta este punto sugiere que Tmem176b constituye un posible blanco terapéutico en el contexto de la autoinmunidad. En este marco, nos propusimos evaluar si su función puede ser modulada de manera terapéutica.

## *2.3 Galectina-1 inhibe al inflamasoma en forma dependiente de TMEM176B y emerge como posible estrategia terapéutica para modular a este canal iónico*

Hasta el momento hemos descrito que Tmem176b tendría un rol protector en la EAE y hemos explorado los distintos mecanismos inmunológicos que podrían explicar su función. Este canal iónico immunoregulador es diana farmacológica de “*Bayk8644*”, quien lo inhibe culminando en una desinhibición de la activación del inflamasoma<sup>52,238,240</sup>. No obstante, en el contexto de la autoinmunidad, una caracterización exhaustiva de TMEM176B como posible blanco terapéutico requiere aún la identificación de sus ligandos endógenos y de las redes moleculares que median su actividad inmunorreguladora. En este marco, distintas líneas de evidencia nos llevaron a pensar que la lectina inmunorreguladora Galectina-1 podría compartir una red molecular junto a TMEM176B, especialmente en la modulación del inflamasoma. En ese sentido, Galectina-1 es capaz de modular la actividad de ciertos canales iónicos<sup>292</sup> así como inhibir la activación del inflamasoma en un modelo de injuria pulmonar aguda<sup>194</sup>. A partir de ello, planteamos la hipótesis de que Galectina-1 podría modular farmacológicamente la actividad de TMEM176B.

Para empezar a explorar nuestra hipótesis decidimos corroborar si en nuestros modelos experimentales Galectina-1 era capaz de inhibir al inflamasoma NLRP3. Para ello, estimulamos macrófagos THP-1 con LPS y nigericina para activar el inflamasoma NLRP3 tanto en ausencia como en presencia de Galectina-1. Observamos que la Galectina-1 inhibió de manera significativa la secreción de IL-1 $\beta$  desencadenada por la nigericina (Figura 29A). Asimismo, evaluamos la activación del inflamasoma en células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón (BMDCs), donde la Galectina-1 inhibió la secreción de IL-1 $\beta$  inducida por nigericina y ATP (Figura 29B, C). Este efecto no pudo explicarse por un eventual efecto tóxico de Galectina-1 sobre las BMDCs ya que la lectina no indujo cambios en la viabilidad celular, al menos para el estímulo con nigericina (Figura 29D), ni en

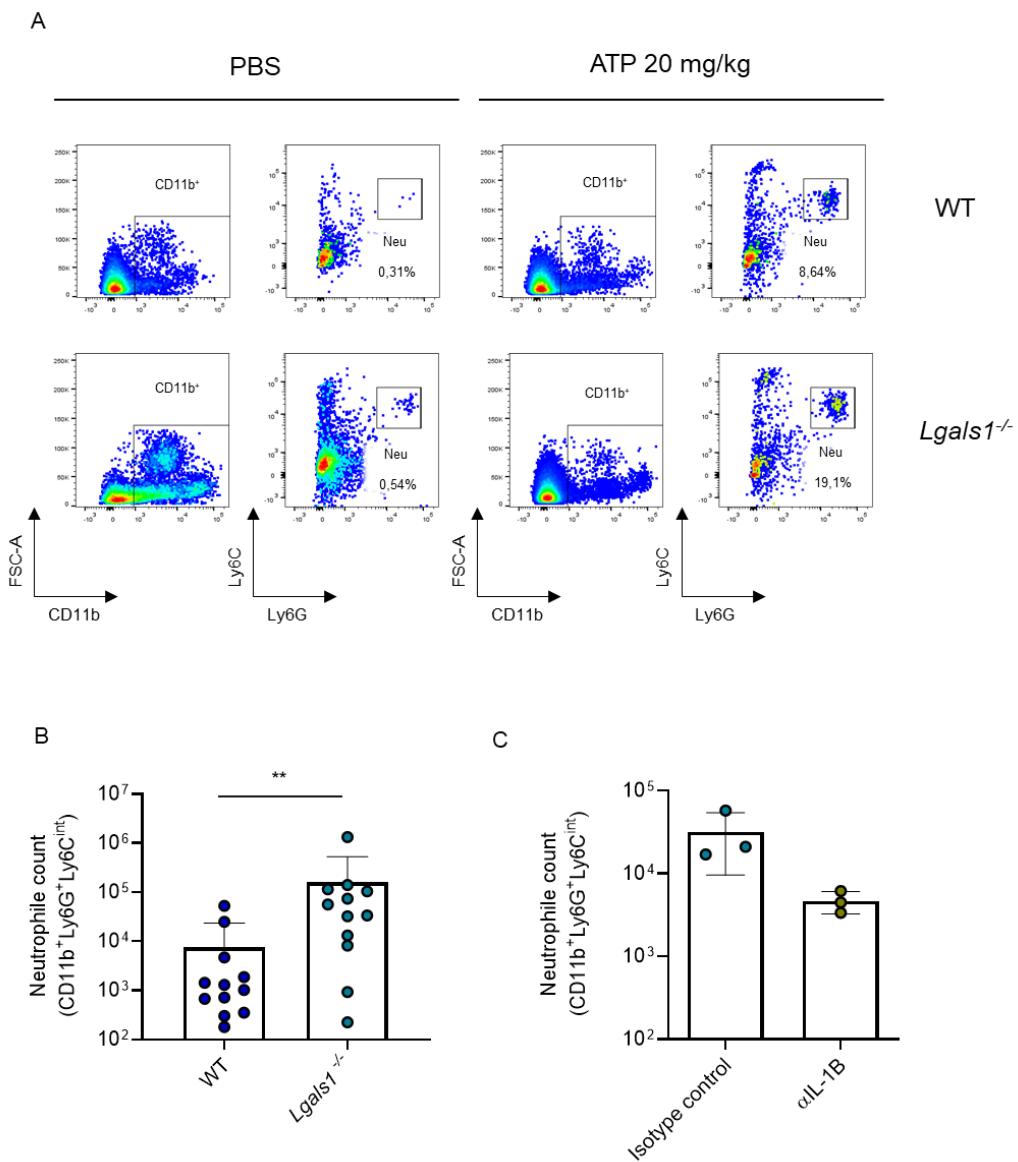
los niveles de otras citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ , para el estímulo con ATP (Figura 29E, F).



**Figura 29. La adición de Galectina-1 es capaz de inhibir al inflamasoma *in vitro*.**

(A) Células THP-1 fueron estimuladas con LPS (0,25  $\mu$ g/mL, 3 horas) y Nigericina (45 min.) a las dosis indicadas, en ausencia o presencia de Galectina-1 (0,3-1  $\mu$ M). Se colectó el sobrenadante de las células y se evaluó la secreción de IL-1 $\beta$  por ELISA. Se muestra un experimento representativo de  $n=2$  experimentos independientes. *One-Way ANOVA: Dunnett's multiple comparisons test* \* $p<0,05$  (B,C) Células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón (BMDCs) fueron estimuladas con LPS (0,25  $\mu$ g/mL, 3 hs) y Nigericina (2,5  $\mu$ M) (B) ó ATP (0,5 mM) (C) por 45 minutos en presencia/ausencia de Gal-1 a las dosis indicadas. Se colectó el sobrenadante y se midió la IL-1 $\beta$  por ELISA. *One-Way ANOVA: Dunnett's multiple comparisons test* \* $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$ . (D) Se estimularon BMDCs en las mismas condiciones que en (B) y luego se marcaron con Anenxin-V y 7AAD para analizar la viabilidad por citometría de flujo. En el panel Izquierdo se muestran dot-plots representativos y en el panel derecho la cuantificación de células viables para las condiciones estudiadas. *Two-Way ANOVA: Turkey's multiple comparisons test*. (ns) (E,F) Se estimularon BMDCs en las mismas condiciones que en (C) y se empleó un ELISA para evaluar la producción de IL-6 (E) y TNF- $\alpha$  (F) en los sobrenadantes. *One-Way ANOVA: Dunnett's multiple comparisons test* (ns).

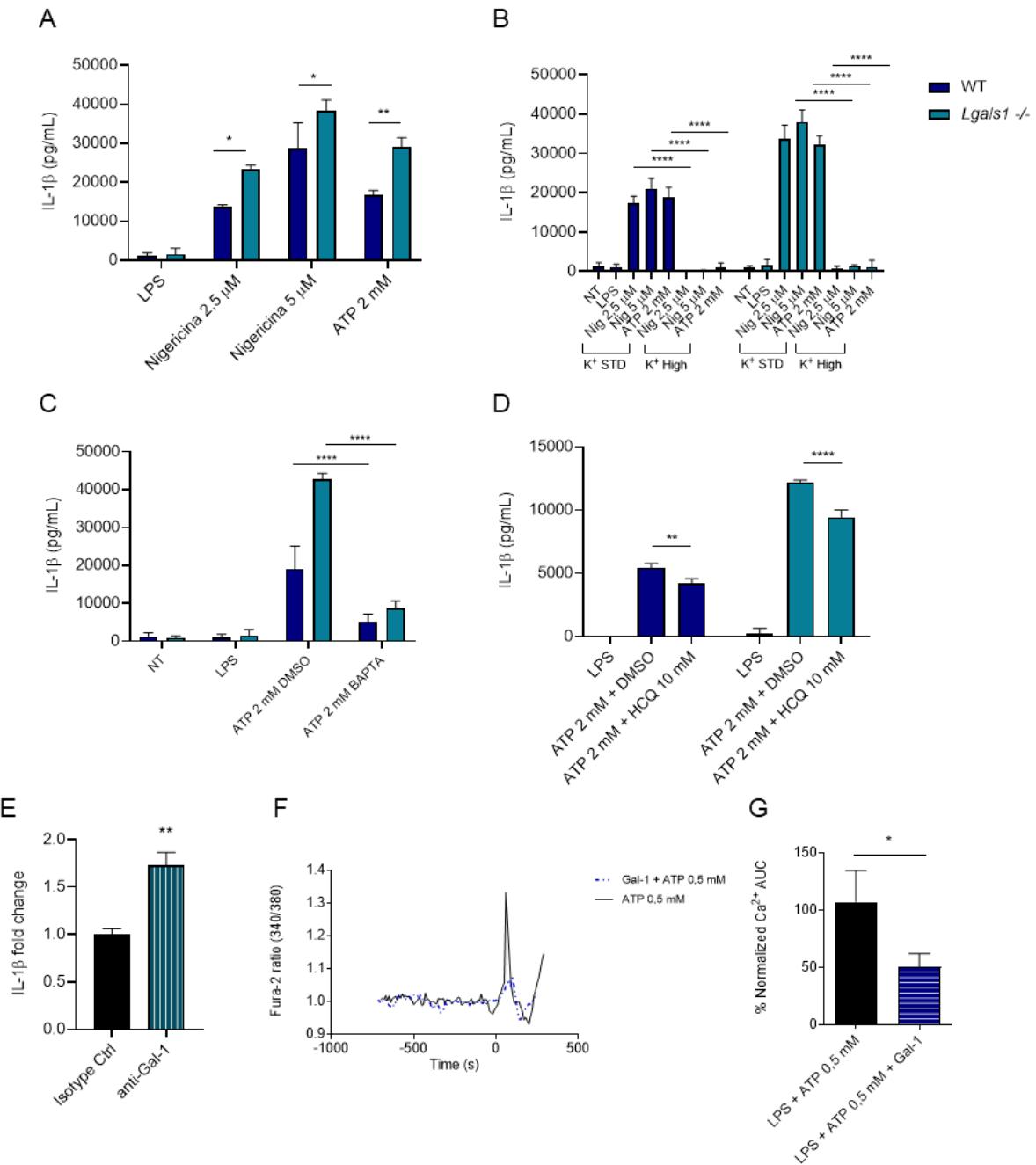
Por otro lado, en el marco de una pasantía realizada en el laboratorio del Dr. Gabriel Rabinovich estudié la activación del inflamasoma NLRP3 *in vivo* e *in vitro* en ratones y células dendríticas *Lgals1*<sup>-/-</sup>. Para ello, analizamos el reclutamiento de neutrófilos al peritoneo post-inyección i.p. de ATP (20 mg/kg) en ratones WT y *Lgals1*<sup>-/-</sup>. Este modelo conforma un modelo de activación del inflamasoma *in vivo*<sup>51,52</sup>. Encontramos un aumento de reclutamiento de neutrófilos al peritoneo en animales *Lgals1*<sup>-/-</sup> (Figura 30A,B) en forma similar a lo reportado para ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup><sup>52</sup>. Además, se evidenció que este efecto podría estar mediado por el inflamasoma, ya que el bloqueo de IL-1 $\beta$  en los ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup> redujo el reclutamiento de neutrófilos (Figura 30C). Sin embargo, el número limitado de animales analizados impidió alcanzar una significancia estadística en esta observación (Figura 30C).



**Figura 30. La deleción de *Lgals1*<sup>-/-</sup> se asoció con un aumento en la activación del inflamasoma *in vivo*.**

Se inyectó ATP 20 mg/kg o PBS i.p. en ratones WT o *Lgals1*<sup>-/-</sup>. A las 4 horas post-inyección se evaluó la presencia de neutrófilos en el lavado peritoneal por citometría de flujo y se realizó su recuento absoluto. (A) Se muestran dot-plots representativos para los grupos WT y *Lgals1*<sup>-/-</sup> que recibieron ATP o PBS. Los neutrófilos se identificaron como la población Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>int</sup> dentro de las CD11b<sup>+</sup>. En todos los casos esto fue analizado dentro de células viables con exclusión de dobletes. (B) Se cuantificó el recuento absoluto de neutrófilos en el lavado peritoneal para los grupos WT y *Lgals1*<sup>-/-</sup> post-inyección de ATP. *Mann-Whitney test* \*\*  $p < 0.01$ . (C) 1 hora previo a la inyección de ATP se administraron 200  $\mu$ g de un anticuerpo  $\alpha$ IL-1 $\beta$  o su isótipo control en animales *Lgals1*<sup>-/-</sup>. Se muestra el recuento absoluto de neutrófilos para cada condición. *Mann-Whitney test*  $p < 0.05$ .

Además, estudiamos *in vitro* si las BMDCs *Lgals1*<sup>-/-</sup> secretaban cantidades superiores de IL-1 $\beta$  en comparación con células WT, como se ha reportado para las BMDCs *Tmem176b*<sup>-/-</sup><sup>52</sup>. En acuerdo, la delección de *Lgals1* en BMDCs tratadas con estímulos activadores del inflamasoma se asoció a un aumento en la secreción de IL-1 $\beta$ , sugiriendo una mayor activación del inflamasoma (Figura 31A). Nos preguntamos entonces cómo podría estar inhibiendo el inflamasoma la Galectina-1 endógena. Para ello, realizamos ensayos de activación del inflamasoma *in vitro* en BMDCs WT y las tratamos con un anticuerpo bloqueante para Galectina-1. Encontramos que el tratamiento con el anticuerpo  $\alpha$ -Gal-1 aumentaba la activación del inflamasoma en estas células, sugiriendo que la Gal-1 debe ser secretada y reingresar a la célula para cumplir su función inhibitoria (Figura 31E). Estas observaciones decidieron ser ahondadas a nivel celular, desde un punto de vista iónico. Nos propusimos entonces, determinar si la Galectina-1 endógena actuaba por mecanismos iónicos similares a los de *Tmem176b*<sup>52</sup>. Para ello, se estimuló el inflamasoma en BMDCs WT y *Lgals1*<sup>-/-</sup> y se evaluó el rol del eflujo de K $^{+}$  y la liberación citosólica de Ca $^{2+}$  en la secreción aumentada de IL-1 $\beta$  en BMDCs *Lgals1*<sup>-/-</sup>. La quelación del Ca $^{2+}$  y el bloqueo del eflujo de K $^{+}$  inhibieron la secreción de IL-1 $\beta$  en BMDCs WT y *Lgals1*<sup>-/-</sup>, de manera análoga a lo ya reportado en BMDCs *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (Figura 31B, C)<sup>52</sup>. Además, el tratamiento con hidroxicloroquina, un inhibidor de canales de K $^{+}$  activados por Ca $^{2+}$  (KCa)<sup>51</sup>, también inhibió la secreción de IL-1 $\beta$  en BMDCs WT y *Lgals1*<sup>-/-</sup> (Figura 31D) en acuerdo con lo observado para BMDCs *Tmem176b*<sup>-/-</sup><sup>52</sup>. Estos resultados sugieren que la activación aumentada del inflamasoma en BMDCs *Lgals1* sería altamente dependiente del balance iónico de Ca $^{2+}$  y K $^{+}$ , y en particular de canales KCa. Para complementar lo observado con la galectina-1 endógena, nos preguntamos si el tratamiento con Galectina-1 exógena podría tener algún efecto sobre el Ca $^{2+}$  citosólico en BMDCs que fueron estimuladas con LPS y ATP. Observamos que el tratamiento con Galectina-1 disminuyó la liberación de Ca $^{2+}$  citosólico inducida por el ATP (Figura 31F-G). En este contexto, Galectina-1 parecería estar actuando mediante mecanismos iónicos similares a los reportados para *Tmem176b*<sup>52</sup>.



**Figura 31. Galectina-1 inhibe el inflamasoma *in vitro* mediante mecanismo iónicos.**

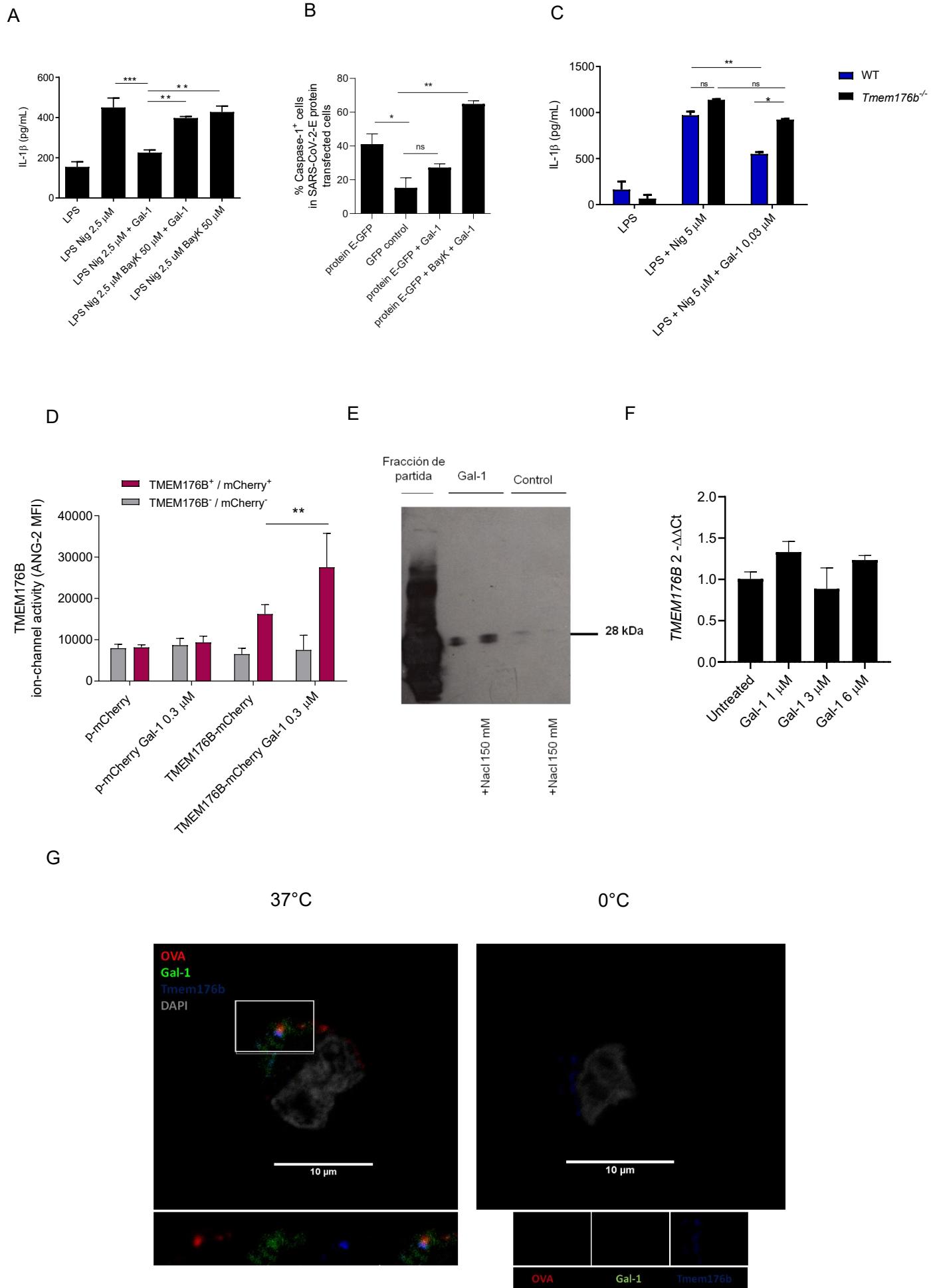
(A) Se estimularon BMDCs WT o *Lgals1*<sup>-/-</sup> con LPS (0,25 μg/mL) durante 3 horas y luego se estimularon con Nigericina 2,5 o 5 μM, o ATP 2 mM durante 2 horas. Se colectaron los sobrenadantes y analizaron por ELISA. Experimento representativo de n=3. *Sidak's multiple comparisons test* \*p<0.05 \*\* p<0.01. (B-D) Se estimularon BMDCs WT o *Lgals1*<sup>-/-</sup> con LPS (0,25 μg/mL) durante 3 horas y ATP 2 mM ó Nigericina (2,5/5 μM) durante 2 horas. En (B) se agregó el quelante BAPTA-AM 15 minutos previo a la estimulación con ATP. Experimento representativo de n=3 experimentos independientes. En (C) se agregó el estímulo Nigericina/ATP en un medio con una concentración estándar de K<sup>+</sup> (5 mM) o alta (140 mM) para bloquear el eflujo. Experimento representativo de n=3 experimentos independientes. En (D) se agregó el inhibidor hidroxicloroquina (10 mM) o su vehículo DMSO 30 minutos antes al estímulo con ATP. Experimento representativo de n=2 experimentos independientes. En todos los casos se colectaron los sobrenadantes y analizaron por ELISA. *Tukey's multiple comparisons test* \*\* p<0.01 \*\*\*\* p<0.0001 (E) BMDCs WT se trataron con LPS (0,25 μg/mL) durante 3 horas y luego se estimularon con Nigericina 2,5 μM en presencia de un anticuerpo anti-Gal-1 (1,5 μM) o su isotipo control. Se colectaron los sobrenadantes y analizaron por ELISA. Se muestra el incremento relativo para la secreción de IL-1β para el conjunto de n=2 experimentos independientes. *One-sample t-test*. \*\* p<0.01. (F-G) Se estimularon BMDCs durante 2 horas con LPS (0,25 μg/mL). Luego, se cargaron con la sonda específica de Ca<sup>2+</sup> Fura-2 (10 mM) y se registró la emisión 340/380 nm por microscopía de *time-lapse*. Se dejaron transcurrir 10 minutos con ó sin Galectina-1 (1 μM) y a t=0 se agregó el ATP (0,5 mM). En (F) se ilustra un experimento representativo para la curva dada por la emisión específica de Ca<sup>2+</sup> (340/380 nm) en presencia de ATP con ó sin Galectina-1. En (G) se muestra el % del área bajo la curva para el pico específico de Ca<sup>2+</sup> inducido por el ATP, con respecto a la condición control (sin Galectina-1) para n=8 experimentos independientes. \*p<0,05 Wilcoxon matched pairs signed Rank test

Sobre esa base, nos preguntamos si Galectina-1 requería de TMEM176B para inhibir la activación del inflamasoma. Para empezar a responder esta pregunta, se estimularon macrófagos THP-1 con Nigericina o se los transfeció con la proteína E del SARS-CoV-2 para activar el inflamasoma. Observamos que Galectina-1 perdió su capacidad inhibitoria cuando las células fueron co-tratadas con BayK8644, el inhibidor farmacológico de TMEM176B (Figura 32A,B). Además, observamos que la Galectina-1 inhibió la secreción de IL-1 $\beta$  en BMDCs WT pero no en células *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (Figura 32C). Estos resultados indican que la inhibición del inflamasoma por parte de Galectina-1 es dependiente de TMEM176B.

A continuación, exploramos si Galectina-1 podía modular farmacológicamente la actividad de TMEM176B. Para ello, empleamos un ensayo ya validado<sup>52</sup> para medir la actividad iónica de TMEM176B, que detecta los niveles de sodio citosólico en células CHO transfectadas con TMEM176B-mCherry o un plásmido control. La adición de Galectina-1 aumentó los niveles de Na<sup>+</sup> citosólico exclusivamente en células transfectadas con *TMEM176B*-mCherry, sin afectar a las no transfectadas o transfectadas con un plásmido control (p-mCherry) (Figura 32D). Estos resultados nos llevaron a plantear la hipótesis de una posible interacción entre ambas proteínas. Para explorar esta posibilidad, primero evaluamos la localización sub-celular de ambas proteínas en células CHO, tanto de la Galectina-1 exógena cuando es internalizada, así como de TMEM176B-mCherry cuando estas células son transfectadas. Dado que TMEM176B se localiza en el compartimento endofagosomal<sup>225,231,235</sup>, utilizamos ovoalbúmina fluorescente para marcar estos organelos. Estudios de microscopía confocal mostraron que TMEM176B y Galectina-1 estarían co-localizando en los endosomas (Figura 32G). Con el objetivo de continuar caracterizando esta interacción, realizamos un análisis *in silico* de sitios de glicosilación en TMEM176B, dado que Galectina-1 reconoce estructuras de N- y O-glicanos<sup>14</sup>. Utilizando los programas “NetNGlyc - 1.0” y “NetOGlyc – 4.0” (DTU Health Tech), no se identificaron sitios de N-glicosilación (no mostrado), pero sí varios sitios potenciales de O-glicosilación (Tabla 6). Para evaluar si estos glicanos podrían mediar la interacción, tratamos las células con

inhibidores de la N- (Swainsonina) y O-glicosilación (Benzyl- $\alpha$ -GalNAc). Sin embargo, estos tratamientos alteraron la actividad iónica basal de TMEM176B, impidiendo obtener resultados concluyentes (no mostrado). Por otra parte, para profundizar en estos aspectos investigamos si existía una interacción física directa entre GAL-1 y TMEM176B. Para abordar esta pregunta, diseñamos un ensayo de *pull-down* (co-precipitación) utilizando beads magnéticas conjugadas a estreptavidina, junto con GAL-1 biotinilada o una proteína control biotinilada, y un lisado celular enriquecido en TMEM176B. Mediante western blot, detectamos la presencia de TMEM176B únicamente cuando el *pull-down* se realizó con GAL-1, pero no con la proteína control (Figura 32E). Además, se comprobó que la adición de Galectina-1 no alteró los niveles de expresión de TMEM176B en células THP-1 (Figura 32F), indicando que los efectos observados no se deben a cambios en la expresión del canal. En conjunto, estos resultados apoyan la existencia de una interacción física entre TMEM176B y Galectina-1, posiblemente mediada por O-glicanos o por interacciones proteína-proteína, con consecuencias funcionales sobre la actividad iónica del canal.

Finalmente, exploramos si el efecto protector de Galectina-1 en la EAE dependía de *Tmem176b*. En concordancia, observamos que Galectina-1 redujo significativamente el score clínico en animales WT, pero no en aquellos *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (Figura 33). Este hallazgo constituye una prueba de concepto de que Galectina-1 puede modular farmacológicamente a *Tmem176b*, estableciendo un vínculo directo entre esta lectina inmunorreguladora y la regulación del curso de la enfermedad autoinmune. En conjunto, los resultados sugieren que *Tmem176b* podría ser un blanco terapéutico funcional de Galectina-1, con relevancia fisiopatológica en la EAE y potencialmente en otros contextos de autoinmunidad.



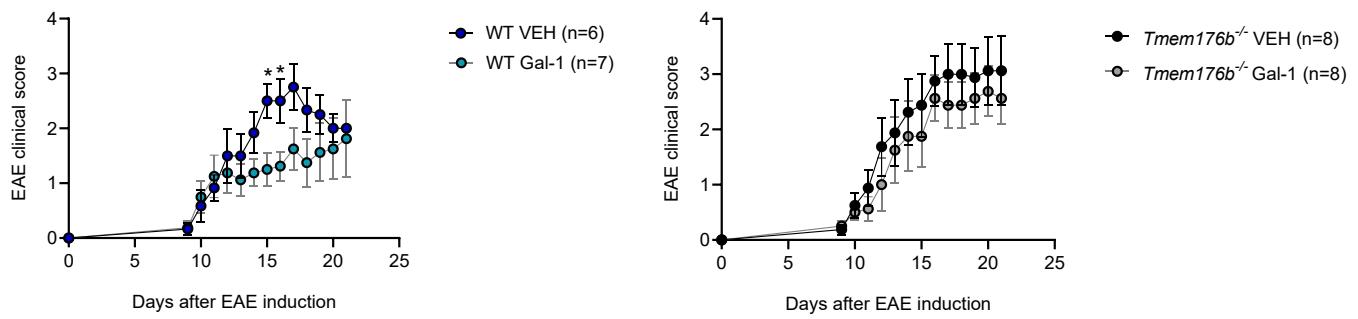
**Figura 32. Galectina-1 interactúa con TMEM176B e inhibe al inflamasoma en forma dependiente de este canal iónico.**

(A) Macrófagos THP-1 fueron tratados con LPS (0,25 µg/ml) durante 3 horas. Seguidamente se lavaron con PBS estéril y fueron tratados con Galectina-1 (0,3 µM) durante 15 minutos e inmediatamente se agregó Nígericina (2,5 µM) durante 45 minutos en presencia o no de BayK8644 (50 µM). El sobrenadante fue colectado y analizado por ELISA. Se muestra un experimento representativo n=3 ensayos independientes. *One-Way ANOVA: Dunnett's multiple comparisons test* \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. (B) Se transfecaron monocitos humanos THP-1 con un plásmido codificante para la proteína E-GFP del SARS-CoV2 o con GFP solo. Estos se cultivaron durante 20 horas en presencia o ausencia de Galectina-1 0,3 µM y Galectina-1 0,3 µM + BayK8644 10 µM. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo, y marcadas con la sonda FLICA-1 específica de la Caspasa-1 activa. Se muestra un experimento representativo de n=3. \* p<0,05 \*\* p<0,01. *One-way ANOVA. Tukey's multiple comparison test* (C) Se estimularon BMDCs con LPS (0,25 µg/ml) durante 3 horas y se lavaron con PBS. Seguidamente, se agregó medio en ausencia ó presencia de Galectina-1 (0,03 µM) durante 15 minutos, y posteriormente se trataron con Nígericina (5 µM) durante 45 minutos. Se colectaron los sobrenadantes y se analizaron por ELISA. Se muestra un experimento representativo n=2 ensayos independientes. *One-Way ANOVA: Dunnett's multiple comparisons test* \* p <0,05; \*\* p <0,01. ns: no significativo. (D) Se transfecaron Células CHO con plásmidos p-mCherryN1 ó p-Tmem176b-mCherryN1. Las células se marcaron con la sonda sensible para sodio ANG-2 y luego se incubaron en ausencia ó presencia de Galectina-1. Se analizó la fluorescencia media (MFI) de ANG-2 en las células viables por citometría de flujo discriminando entre células transfectadas (mCherry+) y no transfectadas (mCherry-). Se muestra un ensayo representativo de n=3 experimentos independientes. *Two-Way ANOVA: Turkey's multiple comparisons test*. \*\* p<0,01. (E) Se incubaron lisados de células CHO Tmem176b-V5-mCherry<sup>+</sup> con Galectina-1 biotinilada o una proteína control biotinilada en TBS-Tween 0,1% con o sin NaCl 150 mM. Las distintas condiciones se co-precipitaron con *beads* magnéticas conjugadas a estreptavidina y la fracción precipitada se visualizó por Western Blot mediante el agregado de un anticuerpo-α-V5-HRP. *Figura representativa de n=2 experimentos independientes*. (F) RT-qPCR para la expression de TMEM176B en células THP-1 sin tratar o tratadas con Galectina-1 durante 48 horas a las dosis indicadas. *One-Way ANOVA: Dunnett's multiple comparisons test*. (G) Células CHO transfectadas con TMEM176B-mCherry fueron tratadas con OVA-Alexa647 (50 µg/ml) y Galectina-1-biotinilada (20 µg/ml) durante 20 minutos a 37°C (panel izquierdo) o 0°C (panel derecho). Tras lavado e incubación para favorecer la internalización, se fijaron con PFA 4% y se marcaron con estreptavidina-FITC y DAPI, se montaron con Prolong-Gold y se adquirieron imágenes por microscopía confocal (Zeiss 800). Las imágenes fueron analizadas con ImageJ; barra de escala: 10 µm.

**Tabla 6.** Predicción de potenciales sitios de O-glicosilación en TMEM176B con el software NetOGlyc 4.0.

El análisis muestra todos los residuos analizados y marca como predicciones positivas aquellas con un *score* mayor a 0.5

<b>No. Residuo</b>	<b>Score</b>	<b>Resultado</b>
2	0.748763	*
9	0.193734	
15	0.828673	*
18	0.643675	*
21	0.760883	*
24	0.195345	
27	0.243353	
31	0.567867	*
39	0.435358	
48	0.413248	
56	0.593947	*
63	0.352746	
75	0.278685	
98	0.116103	
104	0.43549	
107	0.28847	
113	0.388741	
129	0.354948	
143	0.270062	
159	0.422028	
168	0.463134	
172	0.49384	
174	0.40909	
254	0.61574	*
258	0.779751	*
264	0.610925	*
265	0.572021	*

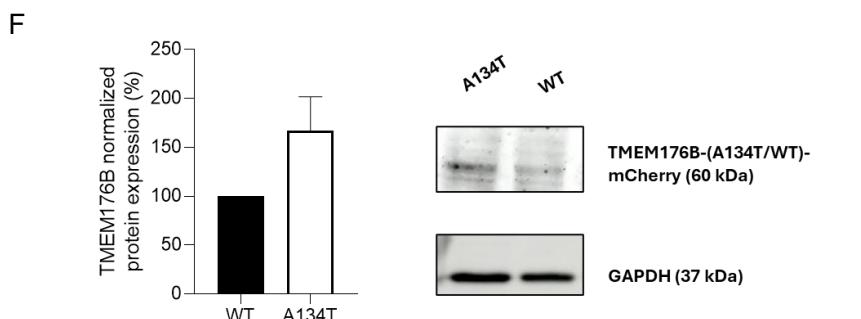
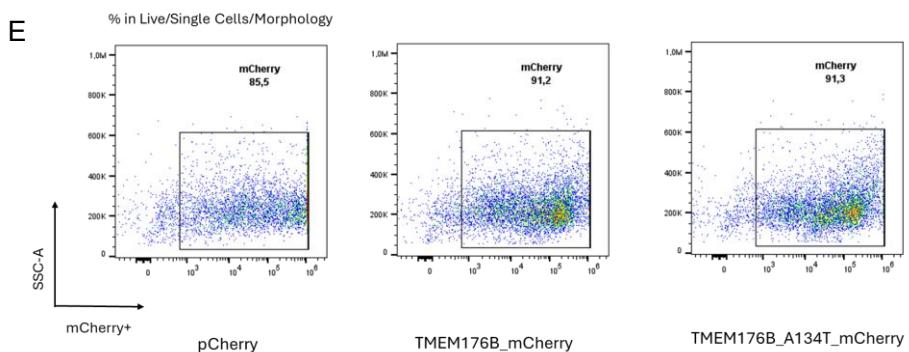
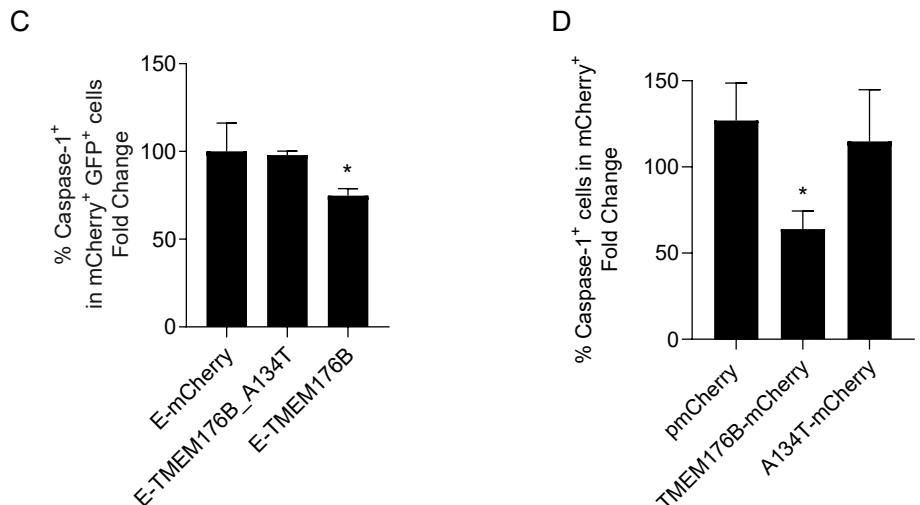
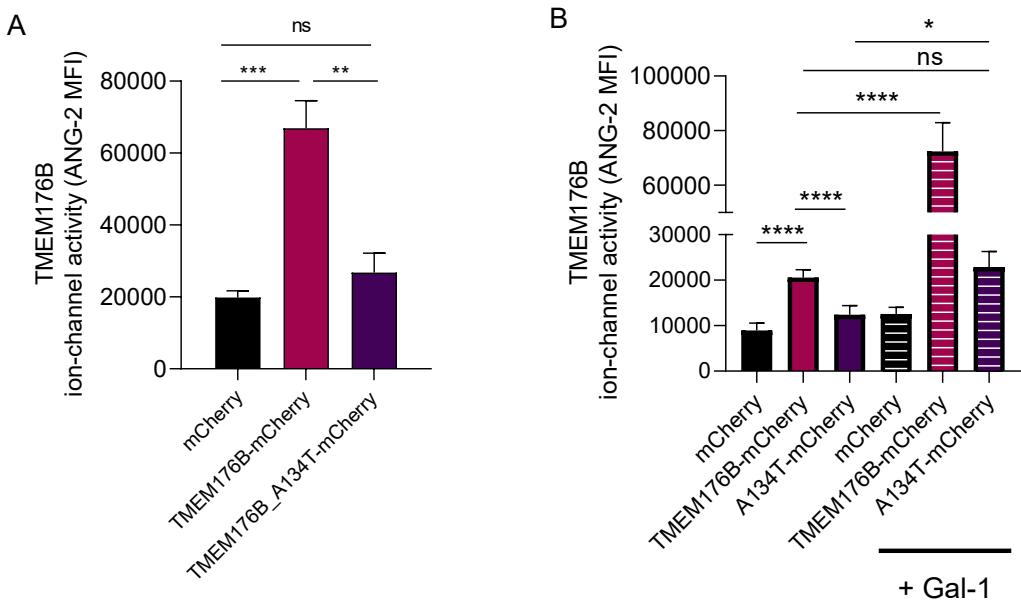


**Figura 33. Respuesta a la encefalomielitis autoinmune (EAE) en ratones WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> tratados con Galectina-1.**

Se inmunizaron hembras entre 9-13 semanas C57BL/6 con 200 µg de péptido MOG-35-55 emulsificado en Adyuvante Completo de Freund (CFA) y se monitorearon diariamente. Se indica el score clínico para ratones WT (panel izquierdo) o *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (panel derecho) tratados con Galectina-1 (100 µg) o su vehículo control (VEH) a los días 9-13 post-inducción. (\*) p < 0.05 Test estadístico Two-way ANOVA con corrección de Bonferroni para múltiple comparación aplicado al score clínico día a día.

## 2.4 El SNP rs2072443 (sustitución A134T) de *TMEM176B* es una variante con pérdida de función que puede ser rescatada por Galectina-1

A partir del rol inmunorregulador observado para *Tmem176b* en la EAE, nos propusimos explorar su relevancia clínica en humanos. En este escenario, decidimos enfocarnos en el polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs2072443 (sustitución A134T en *TMEM176B*), previamente asociado con una mayor activación del inflamasoma, lo que sugiere una pérdida de función en la proteína mutante<sup>252</sup>. Esta evidencia nos llevó a evaluar si la mutación tenía algún impacto a nivel funcional. En acuerdo, la proteína mutante mostró una capacidad disminuida para el transporte iónico en comparación con la WT, que no podría explicarse por diferencias en los niveles de transfección ni de expresión proteica (Figura 34A, E-F). Es de destacar que la figura 34F fue realizada en colaboración con la Dra. Marianela Leporati. Este hallazgo sugiere una alteración estructural o funcional que afecta su actividad como canal iónico. Además, evaluamos la capacidad de la proteína mutante para inhibir el inflamasoma frente a diferentes estímulos. Los resultados mostraron que la proteína mutante mostró una menor eficacia para inhibir la activación del inflamasoma frente a diferentes estímulos como la proteína E del SARS-CoV-2 o la presencia de Nigericina, un activador clásico del inflamasoma (Figura 34C,D). De manera interesante, la actividad iónica de la proteína mutante pudo ser recuperada con la administración de Galectina-1 (Figura 34B). En este contexto, la Galectina-1 podría ofrecer un enfoque terapéutico en patologías autoinmunes como la EM donde esta variante se asocie con una mayor severidad. En su conjunto, estas observaciones permitieron caracterizar al SNP rs2072443 de *TMEM176B* como una variante con pérdida de función, farmacológicamente modulable por Galectina-1.



**Figura 34. El SNP rs2072443 (mutación A134T) de TMEM176B es una variante con pérdida de función.**

(A) Se transfectaron Células CHO con plásmidos p-mCherryN1 ó p-Tmem176b-mCherryN1. Las células se marcaron con la sonda sensible para sodio ANG-2. Se analizó la fluorescencia media (MFI) de ANG-2 en las células viables por citometría de flujo discriminando entre células transfectadas (mCherry+) y no transfectadas (mCherry-). Se muestra un ensayo representativo de n=3 experimentos independientes para la actividad iónica en células transfectadas. *One-Way ANOVA: Tukey's multiple comparisons test.* \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$  (B) El ensayo se realizó igual que en (A) y luego del marcado con la sonda ANG-2 las células se incubaron en presencia/ausencia de Galectina-1. Se muestra un ensayo representativo de n=2 experimentos independientes para la actividad iónica en células transfectadas. *One-Way ANOVA: Tukey's multiple comparisons test.* \*  $p < 0.05$  \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (C) Se co-transfectaron células THP-1 con la proteína E del SARS-CoV2 (plásmido pcDNA3.1-E-GFP) y el plásmido control p-mCherryN1, p-TMEM176B-mCherry-N1 ó p-TMEM176b\_A134T-mCherryN1. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo y marcadas con la sonda FLICA-1 específica de la Caspasa-1 activa. Se cuantificó el porcentaje de células Caspasa-1<sup>+</sup> dentro de las células co-transfectadas y se normalizó por la condición control (co-trasnección con p-mCherry). Se muestra el conjunto (pool) de n=3 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ . *One-sample t-test.* (D) Se transfectaron células THP-1 con el plásmido control p-mCherryN1, p-TMEM176B-mCherry-N1 ó p-TMEM176b\_A134T-mCherryN1 y se las estimuló con Nigericina (2,5  $\mu$ M por 15 minutos) para estudiar la activación del inflamasoma. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo y marcadas con la sonda FLICA-1. Se analizó el incremento en la activación de la Caspasa-1 con respecto a la condición control (pmCherry) para cada transfección. Se muestra el conjunto (pool) de n=3 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ . *One sample t-test.* (E) Dot-plots representativos para la transfección de células CHO con los plásmidos indicados. Las muestras fueron analizadas dentro de la fracción de células viables. (F) Cuantificación de la expresión de TMEM176B en células CHO transfectadas con los plásmidos TMEM176B-WT-mCherry o TMEM176B-A134T-mCherry. La expresión proteica se evaluó por Western Blot y se normalizó respecto a GAPDH. Para cada experimento independiente (n=3), la condición WT se tomó como 100%. Se muestra un Western Blot representativo.

## Discusión

Los resultados de esta tesis representan un esfuerzo por caracterizar la función inmunorreguladora del canal iónico TMEM176B en dos contextos de inflamación patogénica: la infección viral por  $\beta$ -coronavirus y la autoinmunidad, con especial énfasis en el modelo murino de esclerosis múltiple.

Al momento de desarrollar este trabajo, la infección por  $\beta$ -coronavirus cobró especial relevancia en el marco de la pandemia por COVID-19. En ese contexto, se había reportado que la COVID-19 severa se asociaba con la hiperinflamación y respuestas T disfuncionales<sup>122,148-150</sup>. Sin embargo, el vínculo molecular y funcional entre estos dos procesos era poco claro. Además, existía incertidumbre sobre si la modulación de las respuestas de los linfocitos T podía aportar beneficios terapéuticos en esta patología. Reportes previos del grupo habían descrito a TMEM176B como un canal catiónico de carácter inmunorregulador, capaz de inhibir al inflamasoma y modular respuestas T CD8 anti-tumorales. Asimismo, se había reportado un rol asociado a la tolerancia en el alotrasplante. Sin embargo, su rol en otros contextos fisiopatológicos aún no había sido descrito.

En este escenario, reportamos que TMEM176B ejerce un rol protector al inhibir el inflamasoma en infecciones severas mediadas por  $\beta$ -coronavirus como el SARS-CoV-2 en humanos y el MHV-A59 en ratón. Además, demostramos que la activación descontrolada del inflamasoma indujo la disfunción de células T en el contexto de la infección por  $\beta$ -coronavirus. Esto fue respaldado por análisis *in silico* e *in vitro* para el SARS-CoV-2, así como por abordajes *in vivo* e *in vitro* para el virus modelo murino MHV-A59.

En acuerdo con nuestras observaciones sobre el rol protector de TMEM176B, Pekayvaz et. al. reportaron que TMEM176B se encontró aumentado en los monocitos de pacientes con SARS-CoV-2 que no desarrollaron neumonía frente a los que sí lo hicieron<sup>246</sup>. Además, es posible que nuestras observaciones puedan extrapolarse a otras infecciones virales, puesto que Shang et al. describieron que la delección de *TMEM176B* en macrófagos THP-1 resultó en una mayor activación del

inflamasoma NLRP3 y un incremento en la carga viral en la infección por virus influenza<sup>293</sup>. Del mismo modo, la asociación entre la activación del inflamasoma y la gravedad de la enfermedad coincide con lo reportado por datos clínicos previos<sup>72,144</sup>. A pesar de esto, estudios en modelos murinos transgénicos hACE2 sugieren que las citoquinas relacionadas con la activación del inflamasoma, como IL-1 $\beta$  e IL-18, podrían tener un rol protector<sup>143</sup>. Esta observación se contradice con nuestros resultados, así como con los efectos beneficiosos asociados al bloqueo de IL-1 $\beta$  en la COVID-19<sup>144</sup>. En ese sentido, algunos autores han cuestionado el uso de ratones hACE2 para estudiar la activación del inflamasoma<sup>122,294</sup>. En estos modelos, la expresión del receptor hACE2 está dirigida por el promotor HFH4/FOXJ, específico de células epiteliales, por lo que los leucocitos no serían susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, a diferencia de lo que ocurre en la infección en humanos<sup>295</sup>. En consecuencia, la ausencia de infección de leucocitos en estos animales podría no reflejar de manera fiel la activación del inflamasoma descrita en pacientes con COVID-19. Además, la infección por SARS-CoV-2 en ratones transgénicos hACE2 no reproduce la diseminación viral multiorgánica característica de los pacientes con COVID-19, efecto que sí se ha observado en el modelo de infección con MHV-A59<sup>294,296</sup>.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la activación exacerbada del inflamasoma condujo a la disfunción de células T en la infección severa por  $\beta$ -coronavirus. Este constituye un hallazgo relevante, puesto que el rol del inflamasoma en inducir la disfunción o agotamiento de los linfocitos T CD8 $^{+}$  es un mecanismo poco explorado aún<sup>119,120</sup>. A su vez, la presencia o no de agotamiento de linfocitos T CD8 $^{+}$  en la infección por SARS-CoV-2 ha sido motivo de debate. Si bien la generación de linfocitos T CD8 $^{+}$  exhaustos se ha descrito en el contexto de infecciones virales crónicas, estas células pueden adquirir fenotipos disfuncionales en los primeros estadíos de la infección viral aguda<sup>281</sup>. Además, algunos autores han propuesto un vínculo entre las células T CD8 $^{+}$  disfuncionales y fenómenos hiperinflamatorios como ocurre en la sepsis<sup>297-299</sup>.

En esta línea, distintos estudios han reportado que los linfocitos T CD8 $^{+}$  muestran un fenotipo asociado al agotamiento en la infección severa por SARS-

CoV-2, caracterizado por el aumento de receptores inhibidores como PD-1, TIM-3, LAG-3, CTLA-4, NKG2A y CD39<sup>149,150,299-302</sup>. Además, análisis de sc-RNA-seq de PBMCs de pacientes con COVID-19 mostraron que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> pertenecientes al “cluster” efector presentaron un mayor índice de agotamiento, dado por la co-expresión de marcadores como LAG3, TIGIT, PDCD1, CTLA4, HAVCR2 y TOX<sup>303</sup>. En contradicción con estas y nuestras observaciones, otros estudios no lograron identificar una asociación entre el agotamiento T CD8<sup>+</sup> y la severidad de la COVID-19<sup>304</sup>. A su vez, *Rha et. al.* describieron que las células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> SARS-CoV-2-específicas son capaces de producir IFN-γ y por tanto no serían células exhaustas sino funcionales<sup>151</sup>. Las discrepancias en estos estudios podrían estar dadas por diferencias en los criterios para clasificar la enfermedad severa, así como en el conjunto de genes utilizados para definir el agotamiento. Además, entendemos que la expresión de PD-1 no basta para identificar células T exhaustas puesto que podrían ser, efectivamente, células T CD8<sup>+</sup> recientemente activadas<sup>305</sup>. De todas maneras, la evaluación de aspectos funcionales como producción de IFN-γ y TNF-α o capacidad lítica son centrales en la definición de agotamiento.

Nuestros datos aportan evidencia funcional y fenotípica que respalda el agotamiento T CD8<sup>+</sup> en la enfermedad severa por β-coronavirus. Los resultados *in vivo* en el modelo murino mostraron que los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> asociados a una enfermedad más severa presentan linfocitos T CD8<sup>+</sup> con características de agotamiento. A nivel funcional, esto se evidenció por una menor capacidad para inducir citotoxicidad celular específica *in vivo*. Además, dentro de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para MHV-A59, se observó un aumento en el perfil de linfocitos T exhaustos progenitores (TOX<sup>+</sup> TCF-1<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>) que fueron identificados en base a su expresión de factores de transcripción y receptores inhibidores. Complementariamente, nuestros análisis transcriptómicos revelaron una fuerte correlación entre distintos genes asociados al agotamiento en pacientes con COVID-19 severa, patrón que no se observó para los casos moderados. Este hallazgo se reforzó al analizar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes, donde el grupo que cursó una enfermedad severa en CTI presentó un mayor porcentaje de células T

CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> TOX<sup>+</sup> en comparación con el grupo de cuidados moderados (CM). Asimismo, en pacientes de CTI—pero no en los de CM— se detectó una correlación positiva entre PD-1 y TOX, respaldando la co-expresión de este factor de transcripción con PD-1, en línea con la noción de que estos linfocitos T se encuentran exhaustos. Si bien en humanos se ha reportado que las células T de memoria también pueden expresar TOX<sup>283</sup>, las células exhaustas muestran niveles significativamente más altos de TOX en comparación con las células T memoria, que además no expresan PD-1<sup>283</sup>. Por tanto, la correlación positiva entre la expresión de estos genes apoya la interpretación de que las células T CD8<sup>+</sup> se encuentran agotadas en pacientes de CTI. En su conjunto estos hallazgos respaldan la hipótesis de que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> presentan un fenotipo exhausto en infecciones severas por β-coronavirus. Esta tesis aporta además una explicación mecanística a dicho agotamiento, al evidenciar una asociación entre la activación exacerbada del inflamasoma y la disfunción de estas células en el contexto de enfermedad severa. Nuestros resultados apuntan entonces a un eje patogénico inflamasoma-disfunción T y posicionan al inflamasoma como un componente clave que vincula la hiperinflamación con el agotamiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la enfermedad severa por β-coronavirus. En este contexto, cabe considerar que otros mediadores inflamatorios podrían contribuir al agotamiento T CD8<sup>+</sup>. De acuerdo con otros autores, este fenómeno también podría asociarse con la falta de cooperación T CD4<sup>+</sup> o con alteraciones en la respuesta de interferones de tipo I, aunque estos aspectos no fueron abordados en este trabajo<sup>306</sup>.

Desde una perspectiva terapéutica, las células T exhaustas pueden ser moduladas al bloquear la interacción PD-1/PD-L1<sup>153</sup>. Los inhibidores de esta vía permiten rescatar el agotamiento de los linfocitos T y han demostrado su eficacia en contextos oncológicos, mejorando la sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad en pacientes con distintos tipos de cáncer<sup>154</sup>. Sin embargo, al momento de desarrollar este trabajo su potencial terapéutico en el contexto de la COVID-19 aún era desconocido. En este trabajo mostramos que la disfunción T asociada a la infección severa por SARS-CoV-2 podía ser rescatada mediante bloqueadores de PD-1/PD-L1. Además, la administración de anticuerpos anti-PD-1

permitió mejorar la sobrevida y disminuir la carga viral en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> pero no en WT, que cursan cuadros más moderados de la enfermedad.

Estudios clínicos previos habían hipotetizado que el bloqueo de PD-1 en pacientes con cáncer y COVID-19 podría mejorar la respuesta de estas células contra los antígenos del SARS-CoV-2<sup>307</sup>. Sin embargo, en pacientes oncológicos no se logró demostrar que esta terapia mejore el desenlace clínico cuando se administra antes de la infección<sup>308,309</sup>. Por lo tanto, el uso de esta terapia en pacientes con cáncer requiere aún más investigación. A su vez, dado que el bloqueo de PD-1/PD-L1 podría exacerbar la tormenta citoquímica en pacientes con COVID-19 severa, se ha sugerido que los ensayos clínicos para estas terapias deberían concentrarse en los casos moderados<sup>309</sup>. Los hallazgos de nuestro trabajo contradicen esta noción y sugieren que, en escenarios de inflamación exacerbada, como los que se presentan en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, el bloqueo de esta vía puede ser beneficioso y contribuir a la eliminación de la infección viral.

De todos modos, no podemos descartar el riesgo de que estas terapias en entornos de inflamación exacerbada deriven en procesos inmunopatológicos, como se ha descrito en el contexto de la inmunoterapia oncológica. En ese escenario, el bloqueo de PD-1/PD-L1 se ha asociado a eventos adversos inmunomediados (iRAEs), como el síndrome de liberación de citoquinas, neumonitis, colitis y hepatitis<sup>310,311</sup>. Evaluar este efecto en modelos *in vivo* de mayor duración podría aportar más evidencia, aunque este aspecto no fue abordado en este estudio. A pesar de ello, un ensayo clínico de fase 1b indicó que estas terapias serían seguras en el tratamiento de la sepsis<sup>312</sup>. Además, la combinación de bloqueadores PD-1/PD-L1 con otras terapias antiinflamatorias podría optimizar los resultados clínicos y minimizar los efectos adversos. Un ejemplo de ello es el uso de tocilizumab (anticuerpo monoclonal anti-IL-6). Este fármaco se ha usado para combatir los iRAEs asociados a la terapia de bloqueadores de puntos de control en pacientes oncológicos y ha mostrado eficacia para el tratamiento de pacientes con COVID-19 severa<sup>313</sup>.

En su conjunto, nuestros hallazgos proponen una estrategia terapéutica innovadora basada en la reutilización de inmunoterapias contra el cáncer para

tratar la enfermedad severa por  $\beta$ -coronavirus. Estas observaciones están respaldadas por un mecanismo patogénico que vincula el agotamiento T CD8 $^{+}$  a la activación exacerbada de los inflamasomas e identifica a TMEM176B como una molécula inmunorreguladora protectora. En este escenario cabe preguntarse si el uso de fármacos que modulen otros actores de esta vía podría tener un rol terapéutico. En acuerdo, ya se ha reportado que el uso de bloqueadores de la IL-1 $\beta$  mostró un beneficio en pacientes con COVID-19<sup>144,259,314</sup>. En ese mismo sentido, en nuestro modelo murino observamos que los ratones *Tmem176b* $^{-/-}$ *Caspasa-1* $^{-/-}$  mostraron un mejor control de la carga viral y mayor sobrevida al comparar con los animales *Tmem176b* $^{-/-}$ . De manera más novedosa, el uso de compuestos que promuevan la actividad iónica de TMEM176B podría resultar beneficioso. En este trabajo identificamos a la isoqueracetina como un compuesto activador, capaz de rescatar la disfunción de linfocitos T inducida por el SARS-CoV-2 en modelos *in vitro*. En un futuro, sería relevante testear este compuesto u otros posibles activadores *in vivo*. Dado que TMEM176B, además de inhibir al inflamasoma, es capaz de promover la presentación cruzada de antígenos, este tipo de encares podrían favorecer también la activación de linfocitos T CD8 $^{+}$  específicos<sup>228</sup>.

Los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis permitieron identificar un mecanismo que vincula la inflamación con la disfunción de células T en la infección por  $\beta$ -coronavirus. En este contexto, el uso de un  $\beta$ -coronavirus humano como el SARS-CoV-2 y otro murino como el MHV-A59 sugieren que el mecanismo patogénico descrito es de carácter conservado. Además, estos hallazgos ofrecen una perspectiva traslacional al proponer la reutilización de una inmunoterapia oncológica en estos escenarios. Finalmente, TMEM176B emerge como un inmunorregulador protector frente a la severidad en la infección por  $\beta$ -coronavirus.

Estas conclusiones nos llevaron a preguntarnos si TMEM176B podría tener un rol protector en otros contextos donde la inflamación constituya la base mecanística de la patología. Además, los antecedentes de la literatura sugerían que TMEM176B podía tener un rol protector en distintos escenarios de autoinmunidad<sup>248-251</sup>, aunque esto no había sido explorado formalmente. En este escenario,

decidimos explorar la posible función protectora de TMEM176B en un contexto autoinmune como es el de la Esclerosis Múltiple y su modelo murino, la Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE).

En un primer abordaje, nuestros hallazgos mostraron que la expresión de *Tmem176b* se modificaba con la inducción de la EAE y el curso de la enfermedad. A nivel global de la médula espinal, la expresión de *Tmem176b* aumentó en las etapas preclínica (día 9 p.i.) y clínica (día 15 p.i.) en comparación con animales no inducidos o animales en estado de remisión (día 21 p.i.). Este aumento podría estar vinculado a la infiltración de células mieloides inflamatorias —como monocitos, macrófagos y células dendríticas— que expresan *Tmem176b* en altas cantidades o a la inducción de *Tmem176b* como mecanismo contrarregulador de la inflamación<sup>231</sup>. De manera más específica, en la microglía, *Tmem176b* presentó una expresión reducida en animales con EAE (día 21 p.i.) respecto a animales sanos. Esta aparente observación concuerda con estudios previos que mostraron que *Tmem176b* mantiene a las células dendríticas en un estado inmaduro y/o tolerogénico, y que su expresión disminuye cuando estas células maduran o se activan frente a estímulos inflamatorios<sup>231</sup>. Por lo tanto, la reducción de *Tmem176b* en la microglía durante la EAE podría reflejar un proceso análogo de activación o maduración celular.

De manera más directa, nuestros resultados evidenciaron un rol protector para *Tmem176b* en este modelo, lo que se mostró con un aumento significativo en la severidad clínica de la enfermedad en ratones deficientes en *Tmem176b*. Además, identificamos un incremento en otros indicadores asociados con la severidad como la desmielinización, la microgliosis y la relación neutrófilos/linfocitos en sangre periférica. Estos hallazgos contrastan con lo reportado por *Drujont et al.*, quienes no observaron un efecto protector de *Tmem176b* en la EAE<sup>235</sup>. Esta discrepancia podría atribuirse a factores genéticos y/o ambientales que modulan el curso de la enfermedad, como el sexo y la composición de la microbiota intestinal<sup>254–258</sup>. En ese sentido, nuestro estudio se realizó exclusivamente en hembras. Además, las condiciones específicas de los bioterios y las diferencias en la microbiota entre animales criados en Uruguay y

Francia podrían influir en la respuesta inflamatoria. Dado que contamos con colaboración con el grupo francés, esta hipótesis podría abordarse en un futuro y así evaluar si la microbiota influye en la función protectora de *Tmem176b*.

Los antecedentes del equipo y de esta tesis nos llevaron a plantear que *Tmem176b* podría estar jugando su rol protector al inhibir al inflamasoma en el modelo de EAE<sup>52,289</sup>. En acuerdo con esta hipótesis, la severidad aumentada del grupo *Tmem176b*<sup>-/-</sup> se perdió en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Caspasa-1*<sup>-/-</sup> sugiriendo una dependencia del inflamasoma en el efecto observado. Estos resultados concuerdan con reportes previos que vinculan la activación del inflamasoma con la patogénesis de EM/EAE<sup>189-193</sup>. Además, evidenciamos un aumento en la activación de Caspasa-1 en la microglía de la ME de ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> comparado con el grupo WT durante la fase clínica de la EAE (día 15 p.i.). Por otro lado, al analizar los ganglios drenantes en el pico de la enfermedad (día 18 p.i.), observamos que los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mostraron un aumento significativo en la activación de Caspasa-1 para los monocitos/macrófagos Ly6C<sup>high</sup> y una tendencia en ese mismo sentido en las DCs CD11b<sup>+</sup>. Estos hallazgos apoyaron un rol inhibidor del inflamasoma para *Tmem176b* en poblaciones relevantes para la patogénesis de la EAE.

Una de esas poblaciones relevantes es la microglía. Este tipo celular tiene un rol pivotal en la patogénesis de la EM/EAE y distintos autores han sugerido que la activación del inflamasoma en este tipo celular estaría implicada en los procesos de neuroinflamación y progresión de la enfermedad<sup>189,315,316</sup>. Por otra parte, se ha reportado que la población de monocitos CCR2<sup>+</sup> Ly6C<sup>high</sup> es crucial en la fase clínica/efectora para dirigir la progresión de la enfermedad<sup>317</sup>. De hecho, algunos autores han propuesto que los monocitos/macrófagos infiltrantes serían los responsables de producir IL-1 $\beta$  en las lesiones de la materia blanca en la médula espinal de animales con EAE<sup>318-320</sup>. Asimismo, el incremento de Caspasa-1 activa en las DCs CD11b<sup>+</sup> coincide con lo reportado para los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> en modelos de cáncer y de infección por  $\beta$ -coronavirus<sup>52,289</sup>. En línea con estas observaciones, estas células se caracterizan por presentar una alta expresión de *Tmem176b*<sup>321</sup> y se ha reportado que la activación del inflamasoma en DCs es

necesaria para promover la migración de células presentadoras de antígenos y linfocitos T encefalitogénicos hacia el SNC <sup>322</sup>.

No obstante, nuestras observaciones resultan en un principio contradictorias desde un punto de vista espacio-temporal, ya que los ganglios linfáticos drenantes al sitio de inmunización actúan como lugares de activación inicial de células inmunes innatas y linfocitos T durante la EAE. Por lo tanto, sería esperable que la activación del inflamasoma en poblaciones mieloides ocurra primero en el ganglio y luego en la médula espinal <sup>323-326</sup>.

Una posibilidad, es que este aumento se manifieste en los ganglios de forma más temprana al día 15 p.i., punto cinético que no fue evaluado en este trabajo. Así, un incremento temprano de Caspasa-1 en monocitos y DCs de los ganglios (no evaluado antes del día 15 en este trabajo) podría haber contribuido a la generación y migración de células encefalitogénicas, cuya infiltración al SNC promovería luego la activación del inflamasoma en la microglía observado a día 15. Por otro lado, los ganglios drenantes al sitio de inmunización podrían mantener actividad inmunológica más allá de las etapas iniciales de la EAE, convirtiéndose en focos de inflamación sostenida en estadios más tardíos. En acuerdo con esta hipótesis, se ha reportado que la modulación de estos ganglios durante el pico de la enfermedad ejerce un efecto terapéutico en el modelo de EAE <sup>327</sup>. De este modo, el aumento de Caspasa-1 observado en monocitos Ly6C<sup>high</sup> y DCs CD11b<sup>+</sup> del ganglio a día 18 p.i., podría reflejar que, en esa etapa, los ganglios funcionan no solo como sitios de activación inicial, sino también como un tejido inflamatorio secundario que contribuye a la perpetuación de la respuesta inmune. En su conjunto, nuestros resultados mostraron que el rol inhibidor sobre el inflamasoma por parte de Tmem176b cobraría relevancia de forma más temprana (día 15 p.i.) en la microglía de la ME, y más tarde en el pico de la enfermedad en distintas poblaciones mieloides de los ganglios drenantes, particularmente en los monocitos Ly6C<sup>high</sup>. Asimismo, si bien esto no fue explorado, es posible que Tmem176b ejerza un rol aún más temprano (previo al día 15 p.i.) en el control de la activación del inflamasoma en los ganglios drenantes al sitio de inmunización.

Desde un punto de vista mecanístico, la inhibición del inflamasoma por parte de TMEM176B es capaz de modular la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en modelos de cáncer, fenómeno que también describimos en esta tesis en la infección por  $\beta$ -coronavirus<sup>52,289</sup>. Además, en modelos de cáncer, la delección e inhibición farmacológica de *Tmem176b* se vinculó con la regulación de la respuesta Th17<sup>52</sup>. En acuerdo, observamos que la delección de *Tmem176b* tuvo un impacto sobre el compartimento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup> Th17 en la EAE. En primer lugar, detectamos un aumento - aunque no significativo - en el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreactivos activados en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> al comparar con el grupo WT. Estas células podrían estar contribuyendo a la severidad en este grupo de animales. En ese sentido, el rol de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la EM/EAE es controvertido, reportándose funciones patogénicas o protectoras. En particular, la función protectora se ha atribuido a la existencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de carácter regulador<sup>328</sup>. Sin embargo, es probable que esta función supresora esté restringida a una subpoblación dentro de las células T CD8<sup>+</sup>, ya que diversos estudios indican que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> pueden promover la neurotoxicidad e interferir con los procesos de mielinización y re-mielinización, posiblemente al inducir la muerte de los oligodendrocitos<sup>328,329</sup>. En concordancia con esto, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> constituyen la población predominante en las lesiones de pacientes con EM<sup>173-175</sup> y se ha reportado que la transferencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreactivos es capaz de inducir la EAE<sup>328,330,331</sup>.

En segundo lugar, observamos que *Tmem176b* modula las poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> exhaustos. En particular, detectamos un aumento de la población T<sub>pex</sub> en el grupo *Tmem176b*<sup>-/-</sup> al comparar con animales WT o *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp-1*<sup>-/-</sup>. Este aumento es consistente con lo observado en la infección por  $\beta$ -coronavirus y sugiere que el aumento de T<sub>pex</sub> en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> podría estar dado por una activación exacerbada del inflamasoma en la EAE, en acuerdo con el mecanismo descrito anteriormente. Sin embargo, carecemos aún de evidencias más directas que sustenten esta hipótesis. Asimismo, tampoco es claro si estos linfocitos T exhaustos tienen un rol protector, patogénico o si son simplemente una consecuencia del proceso neuroinflamatorio. De hecho, el rol del agotamiento en

la autoinmunidad no ha sido esclarecido y los pocos estudios disponibles presentan visiones dispares.

Por un lado, algunos reportes indican que mientras que el agotamiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se ha asociado con una peor evolución en infecciones virales crónicas, este proceso podría favorecer un mejor desenlace en enfermedades autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal, el LES y la vasculitis asociada a ANCA (*Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrófilos*) <sup>332</sup>. Además, se ha reportado que el agotamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreactivos puede conferir protección frente al daño tisular en la diabetes de tipo I <sup>333</sup>. Por otro lado, se ha sugerido que el factor de transcripción TOX, asociado con el fenotipo exhausto, podría desempeñar un papel en controlar la patogenicidad y favorecer la persistencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreactivos <sup>334,335</sup>. En particular, en modelos murinos de autoinmunidad del SNC, la expresión de TOX se vio aumentada en linfocitos T CD8<sup>+</sup> encefalitogénicos, mientras que las células deficientes en TOX exhibieron un potencial encefalitogénico reducido <sup>334</sup>. Estas observaciones son especialmente relevantes si se considera que la sobreexpresión de TOX basta para inducir un perfil transcripcional característico del agotamiento en linfocitos T CD8<sup>+</sup> <sup>282</sup>. En esta misma línea, en la diabetes de tipo I se reportó que la longevidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreactivos depende de la persistencia de células T CD8<sup>+</sup> con propiedades de células madre, similares a la población T exhausta progenitora <sup>291</sup>.

Esta aparente contradicción podría explicarse por la presencia de distintos estadíos o sub-poblaciones dentro de los linfocitos T exhaustos. Las células T exhaustas terminales, carentes de funciones efectoras, deberían ser protectoras en el contexto de la autoinmunidad mientras que las transitorias, de carácter citotóxico, patogénicas. Por su parte, las Tpex, con capacidad autorrenovativa también podrían contribuir a la patología al facilitar la persistencia de células T CD8<sup>+</sup> autorreactivas. En acuerdo con esta hipótesis, observamos que los ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup> además de presentar un aumento de células Tpex, mostraron una correlación positiva y significativa entre la severidad y la presencia de células T exhaustas transitorias. Estos hallazgos no se observaron para los otros grupos (WT, *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp-1*<sup>-/-</sup>) y podrían explicar la enfermedad más severa en estos

animales. A su vez, los resultados observados en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp1*<sup>-/-</sup> sugieren que el agotamiento en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup> podría estar condicionado por la activación del inflamasoma, similar a lo descrito en este trabajo en la infección por β-coronavirus. Entendemos, de todos modos, que si las células T exhaustas estuviesen mediando la severidad esto debería ser verificado directamente, por ejemplo mediante experimentos de transferencia celular adoptiva. De hecho, hemos planificado experimentos de este tipo en nuestro modelo.

La ausencia de *Tmem176b* también se vinculó con un aumento en la población de células Th17 y de la subpoblación de Th17 patogénicas (IFN-γ<sup>+</sup>) tanto en la ME como en los ganglios drenantes. El aumento en esta población también podría explicar la mayor severidad en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. De hecho, las células Th17 desempeñan un conocido rol patogénico en la progresión de la EM/EAE al alterar la barrera hematoencefálica, activar células inmunes e inhibir la remielinización<sup>336</sup>. En particular, la subpoblación de células Th17 patogénicas (IFN-γ<sup>+</sup>) se asocian con la actividad de la enfermedad y predominan en el LCR de pacientes en etapas tempranas de la EM<sup>337-339</sup>. El aumento en esta población podría ser mediado por una mayor activación del inflamasoma en la microglía/monocitos en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. En acuerdo, la activación del inflamasoma promueve la supervivencia de células Th17 en contextos de autoinmunidad y la IL-1β media la polarización hacia células Th17 de carácter patogénico<sup>340-342</sup>. Este punto podría esclarecerse mediante el uso de nuestros animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Caspasa-1*<sup>-/-</sup> o el bloqueo de la IL-1β en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. Otra posibilidad, es que esta modulación pueda estar dada por un efecto intrínseco de *Tmem176b* en estas células. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que *Tmem176b* se expresa en las células RORγT<sup>+</sup> y es inducido a la alta por este factor de transcripción<sup>235,236</sup>. De manera interesante, se ha reportado que las células Th17 son capaces de activar el inflamasoma a través de un mecanismo dependiente de Caspasa-8<sup>343</sup>. Este aspecto podría ser novedoso en relación al aspecto inmunorregulador de *Tmem176b* y abrir nuevas líneas de investigación. En ese sentido, estudios no publicados de nuestro laboratorio apoyan la hipótesis de que TMEM176B sea un

punto de control intrínseco de las células Th17 humanas y murinas a nivel inmunometabólico.

En su conjunto, nuestros hallazgos respaldan un rol protector e inmunorregulador de Tmem176b en la EAE, modulando la activación del inflamasoma y regulando poblaciones celulares clave en la patogénesis de la enfermedad, como los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y Th17. En este contexto, el inflamasoma y los linfocitos Th17 tienen un rol bien establecido en la patogénesis de la EAE, mientras que el papel de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> ha sido más discutido y dentro de ellos, el de los T CD8<sup>+</sup> exhaustos aún no está completamente esclarecido. Asimismo, no es claro cuál/cuáles de estos mecanismos dirige la severidad en ausencia de Tmem176b y cuáles emergen como consecuencias del proceso neuroinflamatorio exacerbado en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. Nuestros resultados, junto con los datos de la literatura, sugieren que la inhibición del inflamasoma podría ser uno de los mecanismos principales por los que Tmem176b modula el comportamiento de células T en la EAE y protege frente a la severidad. En este contexto comprender con mayor detalle estos procesos será clave para avanzar en la caracterización del papel de Tmem176b en la esclerosis múltiple y su modelo experimental.

Los hallazgos sobre el protector de Tmem176b en la EAE, nos llevaron a plantear que esta molécula podría ser un blanco terapéutico en el control de la enfermedad. En este escenario, nos pareció importante explorar posibles redes moleculares y/o ligandos endógenos implicadas en su rol inmunorregulador. En este trabajo propusimos que Galectina-1 (Gal-1) podría ser una “socio” en la inhibición del inflamasoma de Tmem176b. Gal-1 ha sido descrito como una molécula inmunorreguladora con amplios efectos anti-inflamatorios e inmunorreguladores tanto en escenarios de cáncer como de autoinmunidad<sup>198,199</sup>. Al momento de realizar esta tesis, Huang et. al. reportaron que esta lectina es capaz de inhibir el inflamasoma en un modelo de lesión pulmonar aguda, aunque este efecto no había sido explorado en otros modelos o contextos fisiopatológicos<sup>194</sup>. En este trabajo, demostramos que Gal-1 es capaz de inhibir al inflamasoma mediante abordajes *in vivo* e *in vitro* en monocitos humanos y células dendríticas de ratón.

Este efecto inhibidor se observó tanto para la Gal-1 endógena como para la administración de Gal-1 exógena en forma dependiente de mecanismos iónicos similares a los descritos para Tmem176b, dados por la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (KCa). De manera novedosa, observamos que esta función inhibidora sobre el inflamasoma *in vitro* fue dependiente de *Tmem176b*. Estos resultados nos llevan a postular que TMEM176B y GAL-1 podrían integrar un mismo eje inmunorregulador en la modulación del inflamasoma. En acuerdo con esta posible asociación funcional, observamos que Gal-1 indujo la actividad iónica de TMEM176B. Además, experimentos de coprecipitación e inmunofluorescencia sugieren una interacción física entre GAL-1 y TMEM176B en los endosomas. Esta evidencia es respaldada por estudios de espectrometría de masas en una línea celular de adenocarcinoma pulmonar, que previamente identificaron a Galectina-1 entre las proteínas que interactuaron con TMEM176B<sup>226</sup>. Estas observaciones nos llevaron a preguntarnos de qué manera estarían interactuando Gal-1 con Tmem176b. Un primer abordaje *in silico* sugirió que esta interacción podría estar dándose por O-glicanos o interacciones proteína-proteína. En un segundo abordaje, empleamos inhibidores de la O-glicosilación y N-glicosilación para estudiar la interacción Tmem176b-Galectina-1, pero no pudimos obtener resultados concluyentes. Consideramos que una estrategia más adecuada sería el uso de células *Mgat5<sup>-/-</sup>* o *C2GnT1<sup>-/-</sup>* que presentan una disrupción en la N- y O-glicosilación respectivamente. Alternativamente, el uso de una Gal-1 mutada en su sitio de unión a carbohidratos podría proveer información valiosa; estas herramientas se encuentran disponibles en el laboratorio del Dr. Rabinovich, quien es nuestro colaborador. Por otro lado, aún no entendemos de qué manera GAL-1 promueve la actividad iónica de TMEM176B. Una posibilidad es que esta interacción induzca un cambio conformacional en el canal que potencie su actividad iónica, de manera análoga a lo que se ha reportado para otros miembros de la familia MS4A que son modulados por ligandos<sup>344</sup>. Esta hipótesis podría explorarse mediante estudios *in silico* de “docking” o acoplamiento molecular que permitirían predecir interacciones estructurales entre Galectina-1 y TMEM176B.

El rol modulador de Gal-1 sobre *Tmem176b* también adquirió relevancia fisiopatológica en el contexto de la EAE. En este trabajo reproducimos el efecto terapéutico previamente reportado para Gal-1 en la EAE<sup>195,196</sup>. Sin embargo, esto no se observó en animales deficientes en *Tmem176b*, indicando que la acción protectora de Gal-1 requiere de la presencia de este gen. Aunque no abordamos experimentalmente los mecanismos inmunológicos implicados en este potencial eje protector *Tmem176b/Gal-1*, nuestros resultados y la literatura previa sugieren distintas posibilidades e hipótesis.

En primer lugar, se ha reportado que tanto la Gal-1 endógena como exógena ejercen un efecto protector en la EAE asociado con la modulación de linfocitos T CD4+ productores de IL-17 e IFN-γ, que dependería de la delección selectiva de estas células<sup>196</sup>. A su vez, Starossom *et. al.* (2012) mostraron que Gal-1 también actúa a nivel del SNC, donde inhibe la activación pro-inflamatoria o clásica de la microglía, contribuyendo así a la protección tisular y regeneración axonal en el contexto de la EAE<sup>195</sup>. Si bien estos efectos inmunomoduladores se han atribuido a la interacción de Gal-1 con glicanos en la superficie celular, no es posible descartar la participación de otros mecanismos en su acción inmunorreguladora. Nuestros resultados sugieren que estos mecanismos podrían requerir, directa o indirectamente, la participación de *Tmem176b*. En esta tesis mostramos que Gal-1 inhibe al inflamasoma en forma dependiente de *Tmem176b* y postulamos al inflamasoma como un posible mecanismo mediador de la severidad en animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. La microglía parecería ser una población relevante en este mecanismo, puesto que mostró una activación exacerbada del inflamasoma en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. Además, observamos un aumento en la población microglial total (Iba1<sup>+</sup>) y clásicamente activada (Iba1<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>) en la ME en ausencia de *Tmem176b* que se perdió en ratones *Tmem176b*<sup>-/-</sup>*Casp-1*<sup>-/-</sup>. Este aumento en el número de células microgliales activadas coincide con lo reportado para animales *Lgals1*<sup>-/-</sup><sup>195</sup>. Por lo tanto, la modulación de la activación del inflamasoma y el estado pro-inflamatorio de la microglía podría explicar el efecto terapéutico de Gal-1 dependiente de *Tmem176b*. En este contexto, tampoco es claro si la modulación de *Tmem176b* por parte de Gal-1 puede impactar sobre procesos de regeneración

axonal, por lo que sería relevante explorar las implicancias de este efecto en tiempos más tardíos del modelo en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup>.

Por otro lado, en esta tesis observamos que la delección génica de *Tmem176b* resultó en un aumento en el número de células Th17 totales y Th17 patogénicas. Dado que Gal-1 es capaz de modular las poblaciones T CD4 productoras de IFN-γ e IL-17<sup>196</sup>, este podría presentar otro mecanismo patogénico que sea modulado por el eje Gal-1/*Tmem176b*. Finalmente, Gal-1 podría controlar las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8 exhaustos que parecen estar implicados en la enfermedad más severa de los animales *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. En ese sentido, es poca la evidencia sobre el impacto de la Gal-1 en la biología de los linfocitos T CD8. En cáncer, se ha reportado que esta lectina puede promover el aumento de linfocitos T CD8 reguladores o de carácter supresor que promueven el escape tumoral<sup>345,346</sup>. En otros contextos clínicos como el trasplante, Gal-1 sería necesaria para la tolerancia inmunológica y su deficiencia resulta en un aumento de linfocitos T CD8 antígeno-específicos productores de IFN-γ e IL-17<sup>347</sup>. Sin embargo, el rol de Gal-1 sobre las células T CD8 en contextos autoinmunes o en fenómenos de agotamiento celular aún no ha sido esclarecido. En este escenario, estudios de citometría de flujo así como de sc-RNA-seq en animales WT y *Tmem176b*<sup>-/-</sup> en ausencia/presencia de Gal-1 permitirían esclarecer los mecanismos implicados en el eje Gal-1/*Tmem176b*.

Los hallazgos descritos hasta el momento fueron obtenidos en el modelo murino de EAE. Con el objetivo de aportar relevancia clínica a nuestros resultados, identificamos en humanos al polimorfismo de nucleótido único rs2072443 (sustitución A134T) como una variante de pérdida de función. Estudios previos mostraban una asociación entre esta variante y una mayor activación del inflamasoma, sugiriendo que la mutación confería una pérdida funcional<sup>252</sup>. En ese contexto, demostramos que la variante A134T conduce a una disminución en la actividad iónica del canal y a una menor capacidad para inhibir la activación del inflamasoma. Estos hallazgos sugieren que el residuo A134 cumple un rol importante para la función del canal, aportando información sobre posibles regiones estructurales críticas para la funcionalidad de TMEM176B, cuya estructura

tridimensional aún no ha sido caracterizada. A pesar de ello, el estudio de modelos de “Alphafold” y dinámica molecular podrían aportar información estructural relevante. Por otro lado, si el efecto de TMEM176B observado en la EAE se reprodujera en la EM, variantes genéticas de pérdida de función como rs2072443 podrían asociarse con una mayor severidad del cuadro clínico. En línea con esta idea, Nickles et al. reportaron la existencia de distintos polimorfismos en *TMEM176B* y su homólogo *TMEM176A* formando parte de una firma génica asociada a esclerosis múltiple en sangre periférica<sup>250</sup>. El polimorfismo rs2072443 (A134T) fue identificado en este contexto. Si bien estos hallazgos sugieren un posible rol en la patogénesis, son necesarios estudios adicionales para determinar si este polimorfismo se asocia con la severidad de la enfermedad.

En este escenario, recientemente establecimos una colaboración con la Dra. Florencia Rossetti (*Departamento de Inmunología y Reumatología - Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán*) y estudiamos cohortes humanas de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) que portaban este y otros polimorfismos. Los análisis de pacientes que portaban simultáneamente la variante rs2072443 de *TMEM176B* junto con un SNP (rs741066) de *TMEM176A* revelaron un aumento en el Índice de Actividad de la Enfermedad del LES (En inglés “SLEDAI”) (Figura S1A, Anexo 1) y una tendencia a mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal terminal (Figura S1C-D, Anexo 1). Aunque el polimorfismo de *TMEM176A* resulta en una mutación sinónima que no altera la proteína final, estos datos sugieren que *TMEM176B* y *TMEM176A* podrían actuar de forma conjunta en la regulación de la respuesta inmune en enfermedades autoinmunes. Además, refuerzan la asociación entre la variante rs2072443 en *TMEM176B* y una mayor severidad clínica en contextos de autoinmunidad. Finalmente, en esta tesis observamos que la adición de Galectina-1 fue capaz de restaurar la actividad iónica de la variante A134T de *TMEM176B*. Si bien aún no entendemos la naturaleza de esta interacción, es posible que Gal-1 recupere la funcionalidad de esta variante. En ese escenario, la administración de esta lectina podría tener un potencial terapéutico en enfermedades autoinmunes como el LES, donde la presencia de la mutación A134T se asocie a una evolución más severa. Asimismo, estos hallazgos

abren perspectivas para la activación farmacológica de TMEM176B en escenarios diversos, tal como se ha demostrado en la infección por  $\beta$ -coronavirus *in vitro* en este trabajo, y en un estudio reciente de nuestro grupo, donde la activación de este canal indujo respuestas protectoras en el contexto del alotrasplante <sup>244,289</sup>.

## Conclusiones y perspectivas

En su conjunto, los hallazgos de esta tesis contribuyen a posicionar a TMEM176B como un regulador inmune con un rol protector frente a procesos inflamatorios exacerbados, como la infección por  $\beta$ -coronavirus y la encefalomielitis autoinmune. En este trabajo demostramos que TMEM176B limita la activación del inflamasoma y previene la disfunción de linfocitos T CD8 $^{+}$  durante la infección por  $\beta$ -coronavirus. Además, observamos que protege de la severidad en el modelo de Encefalomielitis Autoinmune Experimental mediante mecanismos que dependen de la inhibición del inflamasoma, la modulación de células T CD8 $^{+}$  exhaustas y Th17 patogénicas. Asimismo, mostramos que este canal iónico puede ser modulado farmacológicamente por moléculas como la Isoquercetina y Galectina-1, e identificamos al eje Tmem176b/Gal-1 como un nuevo eje inmunorregulador con potencial valor terapéutico. Finalmente, caracterizamos un SNP (rs2072443) de TMEM176B en humanos como una variante con pérdida de función, que pudo ser regulada por Gal-1. De confirmarse un papel protector de TMEM176B en la EM, este hallazgo podría representar una vía terapéutica relevante. En este sentido, será fundamental profundizar en los mecanismos mediante los cuales TMEM176B ejerce su función y evaluar su impacto en el contexto clínico de la enfermedad.

Como perspectiva de este trabajo nos hemos propuesto profundizar con precisión los mecanismos por los cuales TMEM176B ejerce un rol protector en la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) y determinar si estos cobran relevancia clínica en la esclerosis múltiple (EM). Para ello, se realizarán estudios de scRNA-seq y transferencia celular adoptiva en el modelo murino, así como análisis de datos transcriptómicos públicos de pacientes con EM. Estos experimentos se enmarcan en un proyecto financiado por la ANII (#FCE\_3\_2024\_1\_180768) donde ocupo el rol de responsable científico. En paralelo, será importante evaluar la asociación entre variantes polimórficas de TMEM176B y la severidad de la enfermedad en cohortes humanas. Con este objetivo, nos hemos propuesto establecer una colaboración con el Departamento de Neurología del Hospital de

Clínicas. De detectarse una asociación entre la variante A134T (SNP rs2072443) de TMEM176B y la severidad de la EM, podríamos avanzar en la generación de un ratón transgénico que porte esta mutación en Tmem176b. Esta línea murina permitiría evaluar de manera más directa la relevancia funcional de este polimorfismo en las encefalomielitis autoinmunes.

Además, nos hemos propuesto estudiar el rol de TMEM176B en otras enfermedades autoinmunes. Con este fin, hemos establecido una colaboración con la Dra. Florencia Rossetti para analizar la asociación entre variantes polimórficas de TMEM176B y el LES. Una perspectiva de este trabajo incluye la implementación de un modelo murino de LES que nos permita evaluar si Tmem176b ejerce una función protectora en este contexto y caracterizar los mecanismos inmunológicos subyacentes.

Asimismo, se buscará dilucidar la interacción física entre Galectina-1 y TMEM176B e identificar los mecanismos mediante los cuales este eje inmunorregulador adquiere relevancia funcional en el contexto de la EAE/EM. En este escenario, sería interesante determinar si Galectina-1 también promueve el efecto protector de TMEM176B frente a la infección por  $\beta$ -coronavirus.

Por otra parte, dado que la actividad de TMEM176B pudo ser modulada farmacológicamente, resultará pertinente estudiar si otras moléculas activadoras de TMEM176B, como la isoqueracetina, podrían tener utilidad terapéutica en enfermedades autoinmunes o infecciosas.

Finalmente, nuestros hallazgos abren la posibilidad de explorar el rol inmunorregulador de TMEM176B en otras condiciones donde la inflamación exacerbada conduzca a la patogénesis, ya sea en el contexto infeccioso o en otras enfermedades autoinmunes más allá de la EM.

## Referencias

1. Headland, S. E. & Norling, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology* **27**, 149–160 (2015).
2. Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Perretti, M. & Teixeira, M. M. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends in Immunology* **40**, 212–227 (2019).
3. Nedeva, C., Menassa, J. & Puthalakath, H. Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 108 (2019).
4. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* **140**, 771–776 (2010).
5. Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M. & Teixeira, M. M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front. Immunol.* **7**, (2016).
6. Serhan, C. N. & Levy, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *Journal of Clinical Investigation* **128**, 2657–2669 (2018).
7. Eming, S. A., Wynn, T. A. & Martin, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* **356**, 1026–1030 (2017).
8. Saclier, M. *et al.* Differentially Activated Macrophages Orchestrate Myogenic Precursor Cell Fate During Human Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells* **31**, 384–396 (2013).
9. Nathan, C. & Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell* **140**, 871–882 (2010).
10. Serhan, C. N., Chiang, N., Dalli, J. & Levy, B. D. Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a016311 (2015).
11. Scannell, M. *et al.* Annexin-1 and Peptide Derivatives Are Released by Apoptotic Cells and Stimulate Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Macrophages. *The Journal of Immunology* **178**, 4595–4605 (2007).
12. Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Teixeira, M. M. & Sousa, L. P. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *Journal of Immunology Research* **2016**, 1–13 (2016).
13. Vago, J. P. *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology* **92**, 249–258 (2012).
14. Sundblad, V., Morosi, L. G., Geffner, J. R. & Rabinovich, G. A. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *The Journal of Immunology* **199**, 3721–3730 (2017).
15. Wallace, J. L., Ianaro, A., Flannigan, K. L. & Cirino, G. Gaseous mediators in resolution of inflammation. *Seminars in Immunology* **27**, 227–233 (2015).
16. Haskó, G. & Cronstein, B. Regulation of Inflammation by Adenosine. *Front. Immunol.* **4**, (2013).

17. Mirakaj, V., Dalli, J., Granja, T., Rosenberger, P. & Serhan, C. N. Vagus nerve controls resolution and pro-resolving mediators of inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **211**, 1037–1048 (2014).
18. Pahwa, R., Goyal, A. & Jialal, I. Chronic Inflammation. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
19. Yousuf, A., Ibrahim, W., Greening, N. J. & Brightling, C. E. T2 Biologics for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* **7**, 1405–1416 (2019).
20. Cutolo, M., Soldano, S. & Smith, V. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. *Expert Review of Clinical Immunology* **15**, 753–764 (2019).
21. Milenkovic, V. M., Stanton, E. H., Nothdurfter, C., Rupprecht, R. & Wetzel, C. H. The Role of Chemokines in the Pathophysiology of Major Depressive Disorder. *IJMS* **20**, 2283 (2019).
22. Needham, E. J. *et al.* The immunological response to traumatic brain injury. *Journal of Neuroimmunology* **332**, 112–125 (2019).
23. Gong, T., Yang, Y., Jin, T., Jiang, W. & Zhou, R. Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes. *Trends in Immunology* **39**, 393–406 (2018).
24. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 137–161 (2012).
25. Paramel, G. V., Sirsjö, A. & Fransén, K. Role of Genetic Alterations in the *NLRP3* and *CARD8* Genes in Health and Disease. *Mediators of Inflammation* **2015**, 846782 (2015).
26. Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237–241 (2006).
27. Halle, A. *et al.* The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- $\beta$ . *Nat Immunol* **9**, 857–865 (2008).
28. Wen, H. *et al.* Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* **12**, 408–415 (2011).
29. Pandey, A., Shen, C., Feng, S. & Man, S. M. Cell biology of inflammasome activation. *Trends in Cell Biology* **31**, 924–939 (2021).
30. Downs, K. P., Nguyen, H., Dorfleutner, A. & Stehlik, C. An overview of the non-canonical inflammasome. *Molecular Aspects of Medicine* **76**, 100924 (2020).
31. Dinarello, C. A. A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol* **41**, 1203–1217 (2011).
32. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* **8**, 1812–1825 (2006).
33. McKee, C. M. & Coll, R. C. NLRP3 inflammasome priming: A riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Journal of Leukocyte Biology* **108**, 937–952 (2020).
34. Swanson, K. V., Deng, M. & Ting, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* **19**, 477–489 (2019).
35. Juliana, C. *et al.* Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 36617–36622 (2012).

36. Song, N. *et al.* NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Molecular Cell* **68**, 185-197.e6 (2017).
37. Huang, Y., Xu, W. & Zhou, R. NLRP3 inflammasome activation and cell death. *Cell Mol Immunol* **18**, 2114–2127 (2021).
38. Paik, S., Kim, J. K., Silwal, P., Sasakawa, C. & Jo, E.-K. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* **18**, 1141–1160 (2021).
39. Brinkschulte, R. *et al.* ATP-binding and hydrolysis of human NLRP3. *Commun Biol* **5**, 1176 (2022).
40. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221–225 (2011).
41. Iyer, S. S. *et al.* Mitochondrial Cardiolipin Is Required for Nlrp3 Inflammasome Activation. *Immunity* **39**, 311–323 (2013).
42. Shimada, K. *et al.* Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity* **36**, 401–414 (2012).
43. Vanaja, S. K., Rathinam, V. A. K. & Fitzgerald, K. A. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in Cell Biology* **25**, 308–315 (2015).
44. Muñoz-Planillo, R. *et al.* K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* **38**, 1142–1153 (2013).
45. Murakami, T. *et al.* Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 11282–11287 (2012).
46. Tang, T. *et al.* CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun* **8**, 202 (2017).
47. Schorn, C. *et al.* Sodium Overload and Water Influx Activate the NALP3 Inflammasome. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 35–41 (2011).
48. Rajamäki, K. *et al.* Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PLoS ONE* **5**, e11765 (2010).
49. Yan, Z., Li, S., Liang, Z., Tomic, M. & Stojilkovic, S. S. The P2X7 Receptor Channel Pore Dilates under Physiological Ion Conditions. *The Journal of General Physiology* **132**, 563–573 (2008).
50. Di, A. *et al.* The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. *Immunity* **49**, 56-65.e4 (2018).
51. Eugenia Schroeder, M. *et al.* Pro-inflammatory Ca<sup>++</sup>-activated K<sup>+</sup> channels are inhibited by hydroxychloroquine. *Sci Rep* **7**, 1892 (2017).
52. Segovia, M. *et al.* Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. *Cancer Cell* **35**, 767-781.e6 (2019).
53. Perregaux, D. & Gabel, C. A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 15195–15203 (1994).

54. He, Y., Zeng, M. Y., Yang, D., Motro, B. & Núñez, G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* **530**, 354–357 (2016).
55. Groß, C. J. et al. K + Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* **45**, 761–773 (2016).
56. Li, C., Chen, M., He, X. & Ouyang, D. A mini-review on ion fluxes that regulate NLRP3 inflammasome activation. *ABBS* **53**, 131–139 (2020).
57. Chu, J. et al. Cholesterol-dependent cytolsins induce rapid release of mature IL-1 $\beta$  from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner. *Journal of Leukocyte Biology* **86**, 1227–1238 (2009).
58. Feldmeyer, L. et al. The Inflammasome Mediates UVB-Induced Activation and Secretion of Interleukin-1 $\beta$  by Keratinocytes. *Current Biology* **17**, 1140–1145 (2007).
59. Lee, G.-S. et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca $^{2+}$  and cAMP. *Nature* **492**, 123–127 (2012).
60. Csordás, G. & Hajnóczky, G. SR/ER-mitochondrial local communication: Calcium and ROS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1787**, 1352–1362 (2009).
61. Verhoef, P. A., Kerteszy, S. B., Lundberg, K., Kahlenberg, J. M. & Dubyak, G. R. Inhibitory Effects of Chloride on the Activation of Caspase-1, IL-1 $\beta$  Secretion, and Cytolysis by the P2X7 Receptor. *The Journal of Immunology* **175**, 7623–7634 (2005).
62. Sørensen, M. V. et al. Potassium acts through mTOR to regulate its own secretion. *JCI Insight* **5**, e126910, 126910 (2019).
63. Scambler, T. et al. ENaC-mediated sodium influx exacerbates NLRP3-dependent inflammation in cystic fibrosis. *eLife* **8**, e49248 (2019).
64. Zu, Y., Wan, L.-J., Cui, S.-Y., Gong, Y.-P. & Li, C.-L. The mitochondrial Na(+)/Ca(2+) exchanger may reduce high glucose-induced oxidative stress and nucleotide-binding oligomerization domain receptor 3 inflammasome activation in endothelial cells. *J Geriatr Cardiol* **12**, 270–278 (2015).
65. Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A. & Kolodner, R. D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle–Wells syndrome. *Nat Genet* **29**, 301–305 (2001).
66. Zhou, Y. et al. Lipoxin A4 attenuates MSU-crystal-induced NLRP3 inflammasome activation through suppressing Nrf2 thereby increasing TXNRD2. *Front. Immunol.* **13**, 1060441 (2022).
67. Yao, J., Sterling, K., Wang, Z., Zhang, Y. & Song, W. The role of inflammasomes in human diseases and their potential as therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther* **9**, 10 (2024).
68. Duewell, P. et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
69. Negash, A. A. et al. IL-1 $\beta$  Production through the NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. *PLoS Pathog* **9**, e1003330 (2013).

70. Malinczak, C.-A. *et al.* NLRP3-Inflammasome Inhibition during Respiratory Virus Infection Abrogates Lung Immunopathology and Long-Term Airway Disease Development. *Viruses* **13**, 692 (2021).
71. Li, Y., Wei, X., Ji, S., Gui, S. & Zhang, S. In vivo effects of the NLRP1/NLRP3 inflammasome pathway on latent respiratory virus infection. *Int J Mol Med* <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3521> (2018) doi:10.3892/ijmm.2018.3521.
72. Rodrigues, T. S. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *Journal of Experimental Medicine* **218**, e20201707 (2020).
73. Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* **20**, 363–374 (2020).
74. Wong, L.-Y. R. & Perlman, S. Immune dysregulation and immunopathology induced by SARS-CoV-2 and related coronaviruses — are we our own worst enemy? *Nat Rev Immunol* **22**, 47–56 (2022).
75. Blevins, H. M., Xu, Y., Biby, S. & Zhang, S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front. Aging Neurosci.* **14**, 879021 (2022).
76. Gordon, R. *et al.* Inflammasome inhibition prevents  $\alpha$ -synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaah4066 (2018).
77. Soares, J. L., Oliveira, E. M. & Pontillo, A. Variants in NLRP3 and NLRC4 inflammasome associate with susceptibility and severity of multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* **29**, 26–34 (2019).
78. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621–667 (2002).
79. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* **16**, 343–353 (2015).
80. Condotta, S. A., Rai, D., James, B. R., Griffith, T. S. & Badovinac, V. P. Sustained and Incomplete Recovery of Naive CD8+ T Cell Precursors after Sepsis Contributes to Impaired CD8+ T Cell Responses to Infection. *The Journal of Immunology* **190**, 1991–2000 (2013).
81. Duong, S. *et al.* Polymicrobial Sepsis Alters Antigen-Dependent and -Independent Memory CD8 T Cell Functions. *The Journal of Immunology* **192**, 3618–3625 (2014).
82. Martin, M. D., Badovinac, V. P. & Griffith, T. S. CD4 T Cell Responses and the Sepsis-Induced Immunoparalysis State. *Front. Immunol.* **11**, 1364 (2020).
83. Boomer, J. S. *et al.* Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA* **306**, 2594 (2011).
84. De, A. K. *et al.* Induction of Global Anergy Rather Than Inhibitory Th2 Lymphokines Mediates Posttrauma T Cell Immunodepression. *Clinical Immunology* **96**, 52–66 (2000).
85. Cabrera-Perez, J. *et al.* Alterations in Antigen-Specific Naive CD4 T Cell Precursors after Sepsis Impairs Their Responsiveness to Pathogen Challenge. *The Journal of Immunology* **194**, 1609–1620 (2015).

86. Pachot, A. *et al.* Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clinical Immunology* **114**, 61–69 (2005).
87. Zhang, Y. *et al.* Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care* **15**, R70 (2011).
88. Chen, C. *et al.* Cutting Edge: 2B4-Mediated Coinhibition of CD4+ T Cells Underlies Mortality in Experimental Sepsis. *The Journal of Immunology* **199**, 1961–1966 (2017).
89. Shubin, N. J., Monaghan, S. F., Heffernan, D. S., Chung, C.-S. & Ayala, A. B and T lymphocyte attenuator expression on CD4+ T-cells associates with sepsis and subsequent infections in ICU patients. *Crit Care* **17**, R276 (2013).
90. Gurung, P. *et al.* Immune Unresponsiveness to Secondary Heterologous Bacterial Infection after Sepsis Induction Is TRAIL Dependent. *The Journal of Immunology* **187**, 2148–2154 (2011).
91. Unsinger, J. *et al.* Sepsis-Induced Apoptosis Leads to Active Suppression of Delayed-Type Hypersensitivity by CD8+ Regulatory T Cells through a TRAIL-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology* **184**, 6766–6772 (2010).
92. Wei, S. C. *et al.* Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell* **170**, 1120–1133.e17 (2017).
93. McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S. & Wherry, E. J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 457–495 (2019).
94. Dominguez-Villar, M. & Hafler, D. A. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol* **19**, 665–673 (2018).
95. Raphael, I., Joern, R. R. & Forsthuber, T. G. Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases. *Cells* **9**, 531 (2020).
96. Muranski, P. & Restifo, N. P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121**, 2402–2414 (2013).
97. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
98. Schinnerling, K., Aguillón, J. C., Catalán, D. & Soto, L. The role of interleukin-6 signalling and its therapeutic blockage in skewing the T cell balance in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology* **189**, 12–20 (2017).
99. Schnell, A., Littman, D. R. & Kuchroo, V. K. TH17 cell heterogeneity and its role in tissue inflammation. *Nat Immunol* **24**, 19–29 (2023).
100. Cătană, C.-S. *et al.* Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *WJG* **21**, 5823–5830 (2015).
101. Ghoreschi, K. *et al.* Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling. *Nature* **467**, 967–971 (2010).
102. Sun, L., Su, Y., Jiao, A., Wang, X. & Zhang, B. T cells in health and disease. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 235 (2023).
103. Collier, J. L., Weiss, S. A., Pauken, K. E., Sen, D. R. & Sharpe, A. H. Not-so-opposite ends of the spectrum: CD8+ T cell dysfunction across chronic infection, cancer and autoimmunity. *Nat Immunol* **22**, 809–819 (2021).

104. Gao, Z., Feng, Y., Xu, J. & Liang, J. T-cell exhaustion in immune-mediated inflammatory diseases: New implications for immunotherapy. *Front. Immunol.* **13**, 977394 (2022).
105. Miller, B. C. et al. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol* **20**, 326–336 (2019).
106. Siddiqui, I. et al. Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8+ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* **50**, 195-211.e10 (2019).
107. Hudson, W. H. et al. Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1+ Stem-like CD8+ T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **51**, 1043-1058.e4 (2019).
108. Beltra, J.-C. et al. Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity* **52**, 825-841.e8 (2020).
109. Galletti, G. et al. Two subsets of stem-like CD8+ memory T cell progenitors with distinct fate commitments in humans. *Nat Immunol* **21**, 1552–1562 (2020).
110. Zander, R. et al. CD4+ T Cell Help Is Required for the Formation of a Cytolytic CD8+ T Cell Subset that Protects against Chronic Infection and Cancer. *Immunity* **51**, 1028-1042.e4 (2019).
111. Zehn, D., Thimme, R., Lugli, E., De Almeida, G. P. & Oxenius, A. ‘Stem-like’ precursors are the fount to sustain persistent CD8+ T cell responses. *Nat Immunol* **23**, 836–847 (2022).
112. Zarour, H. M. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clinical Cancer Research* **22**, 1856–1864 (2016).
113. Ni, G. et al. Manipulating IL-10 signalling blockade for better immunotherapy. *Cellular Immunology* **293**, 126–129 (2015).
114. Deryck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* **425**, 577–584 (2003).
115. Papariantafyllou, M. Distilling regulatory T cell inducers. *Nat Rev Immunol* **13**, 547–547 (2013).
116. Teijaro, J. R. et al. Persistent LCMV Infection Is Controlled by Blockade of Type I Interferon Signaling. *Science* **340**, 207–211 (2013).
117. Wilson, E. B. et al. Blockade of Chronic Type I Interferon Signaling to Control Persistent LCMV Infection. *Science* **340**, 202–207 (2013).
118. Wu, T. et al. The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. *Sci. Immunol.* **1**, eaai8593 (2016).
119. Hill, M., Segovia, M., Russo, S., Girotti, M. R. & Rabinovich, G. A. The Paradoxical Roles of Inflammation during PD-1 Blockade in Cancer. *Trends in Immunology* **41**, 982–993 (2020).
120. Chen, L. et al. Blockage of the NLRP3 inflammasome by MCC950 improves anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 2045–2058 (2018).

121. Fehr, A. R. & Perlman, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. in *Coronaviruses* (eds. Maier, H. J., Bickerton, E. & Britton, P.) vol. 1282 1–23 (Springer New York, New York, NY, 2015).
122. Lee, S., Channappanavar, R. & Kanneganti, T.-D. Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. *Trends in Immunology* **41**, 1083–1099 (2020).
123. Hamming, I. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *The Journal of Pathology* **203**, 631–637 (2004).
124. Xu, H. et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* **12**, 8 (2020).
125. Jia, H. P. et al. ACE2 Receptor Expression and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Depend on Differentiation of Human Airway Epithelia. *J Virol* **79**, 14614–14621 (2005).
126. Chen, I.-Y., Moriyama, M., Chang, M.-F. & Ichinohe, T. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporin 3a Activates the NLRP3 Inflammasome. *Front. Microbiol.* **10**, 50 (2019).
127. Islamuddin, M. et al. Innate Immune Response and Inflammasome Activation During SARS-CoV-2 Infection. *Inflammation* **45**, 1849–1863 (2022).
128. Zheng, M. et al. Impaired NLRP3 inflammasome activation/pyroptosis leads to robust inflammatory cell death via caspase-8/RIPK3 during coronavirus infection. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 14040–14052 (2020).
129. Ambrožek-Latecka, M. et al. SARS-CoV-2 and its ORF3a, E and M viroporins activate inflammasome in human macrophages and induce of IL-1 $\alpha$  in pulmonary epithelial and endothelial cells. *Cell Death Discov.* **10**, 191 (2024).
130. Yalcinkaya, M. et al. Modulation of the NLRP3 inflammasome by Sars-CoV-2 Envelope protein. *Sci Rep* **11**, 24432 (2021).
131. Xu, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine* **8**, 420–422 (2020).
132. Tian, S. et al. Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* **15**, 700–704 (2020).
133. Chen, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet* **395**, 507–513 (2020).
134. Ruan, Q., Yang, K., Wang, W., Jiang, L. & Song, J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med* **46**, 846–848 (2020).
135. Zhang, B. et al. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028191> (2020).
136. The WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group et al. Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA* **324**, 1330 (2020).

137. The REMAP-CAP Investigators. Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 1491–1502 (2021).
138. Temesgen, Z. *et al.* Lenzilumab in hospitalised patients with COVID-19 pneumonia (LIVE-AIR): a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Respiratory Medicine* **10**, 237–246 (2022).
139. Merad, M., Blish, C. A., Sallusto, F. & Iwasaki, A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science* **375**, 1122–1127 (2022).
140. Zhang, Q. *et al.* Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, eabd4570 (2020).
141. Bastard, P. *et al.* Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, eabd4585 (2020).
142. Chang, S. E. *et al.* New-onset IgG autoantibodies in hospitalized patients with COVID-19. *Nat Commun* **12**, 5417 (2021).
143. Wang, E. Y. *et al.* Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature* **595**, 283–288 (2021).
144. Huet, T. *et al.* Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study. *Lancet Rheumatol* **2**, e393–e400 (2020).
145. Mathew, D. *et al.* Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* **369**, eabc8511 (2020).
146. Lucas, C. *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* **584**, 463–469 (2020).
147. Kaneko, N. *et al.* Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell* **183**, 143–157.e13 (2020).
148. Zhou, R. *et al.* Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity* **53**, 864–877.e5 (2020).
149. Zheng, H.-Y. *et al.* Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* **17**, 541–543 (2020).
150. Zheng, M. *et al.* Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* **17**, 533–535 (2020).
151. Rha, M.-S. *et al.* PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8+ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. *Immunity* **54**, 44–52.e3 (2021).
152. Hotchkiss, R. S. *et al.* Immune checkpoint inhibition in sepsis: a Phase 1b randomized study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of nivolumab. *Intensive Care Med* **45**, 1360–1371 (2019).
153. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
154. Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **359**, 1350–1355 (2018).
155. McGinley, M. P., Goldschmidt, C. H. & Rae-Grant, A. D. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA* **325**, 765 (2021).

156. Attfield, K. E., Jensen, L. T., Kaufmann, M., Friese, M. A. & Fugger, L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* **22**, 734–750 (2022).
157. Correa, E., Paredes, V. & Martínez, B. Prevalence of multiple sclerosis in Latin America and its relationship with European migration. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical* **2**, 205521731666640 (2016).
158. Ramien, C. et al. Sex effects on inflammatory and neurodegenerative processes in multiple sclerosis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **67**, 137–146 (2016).
159. Dendrou, C. A. & Fugger, L. Immunomodulation in multiple sclerosis: promises and pitfalls. *Current Opinion in Immunology* **49**, 37–43 (2017).
160. Rodríguez Murúa, S., Farez, M. F. & Quintana, F. J. The Immune Response in Multiple Sclerosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **17**, 121–139 (2022).
161. Sospedra, M. & Martin, R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* **36**, 115–127 (2016).
162. Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B. & Ciccarelli, O. Multiple sclerosis. *The Lancet* **391**, 1622–1636 (2018).
163. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium & The Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* **476**, 214–219 (2011).
164. Ascherio, A., Munger, K. L. & Lünemann, J. D. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* **8**, 602–612 (2012).
165. Dendrou, C. A., Fugger, L. & Friese, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* **15**, 545–558 (2015).
166. Bjornevik, K., Münz, C., Cohen, J. I. & Ascherio, A. Epstein–Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. *Nat Rev Neurol* <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00775-5> (2023) doi:10.1038/s41582-023-00775-5.
167. Baecher-Allan, C., Kaskow, B. J. & Weiner, H. L. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* **97**, 742–768 (2018).
168. Gran, B., Hemmer, B., Vergelli, M., McFarland, H. F. & Martin, R. Molecular mimicry and multiple sclerosis: Degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity. *Ann Neurol* **45**, 559–567 (1999).
169. Coisne, C., Mao, W. & Engelhardt, B. Cutting Edge: Natalizumab Blocks Adhesion but Not Initial Contact of Human T Cells to the Blood-Brain Barrier In Vivo in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology* **182**, 5909–5913 (2009).
170. Martin, R., Bielekova, B., Gran, B. & McFarland, H. F. Lessons from studies of antigen-specific T cell responses in Multiple Sclerosis. in *Advances in Research on Neurodegeneration* (eds. Riederer, P. et al.) 361–373 (Springer Vienna, Vienna, 2000). doi:10.1007/978-3-7091-6301-6\_26.
171. Murphy, Á. C., Lalor, S. J., Lynch, M. A. & Mills, K. H. G. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, Behavior, and Immunity* **24**, 641–651 (2010).

172. Tahmasebinia, F. & Pourgholaminejad, A. The role of Th17 cells in auto-inflammatory neurological disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **79**, 408–416 (2017).
173. Bitsch, A. Acute axonal injury in multiple sclerosis: Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* **123**, 1174–1183 (2000).
174. Machado-Santos, J. et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain* **141**, 2066–2082 (2018).
175. Fransen, N. L. et al. Tissue-resident memory T cells invade the brain parenchyma in multiple sclerosis white matter lesions. *Brain* **143**, 1714–1730 (2020).
176. Malmstrom, C. et al. Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. *Journal of Neuroimmunology* **196**, 159–165 (2008).
177. Jilek, S. et al. CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clinical Immunology* **123**, 105–113 (2007).
178. Ifergan, I. et al. Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on 4 integrin. *Brain* **134**, 3560–3577 (2011).
179. Jacobsen, M. et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* **125**, 538–550 (2002).
180. Haase, S. & Linker, R. A. Inflammation in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* **14**, 17562864211007687 (2021).
181. Bar-Or, A. et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Annals of Neurology* **67**, 452–461 (2010).
182. Kouwenhoven, M., Teleshova, N., Özenci, V., Press, R. & Link, H. Monocytes in multiple sclerosis: phenotype and cytokine profile. *Journal of Neuroimmunology* **112**, 197–205 (2001).
183. Makhlof, K., Weiner, H. L. & Khouri, S. J. Increased percentage of IL-12+ monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS. *Journal of Neuroimmunology* **119**, 145–149 (2001).
184. Kornek, B. & Lassmann, H. Neuropathology of multiple sclerosis—new concepts. *Brain Research Bulletin* **61**, 321–326 (2003).
185. Lucchinetti, C. et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* **47**, 707–717 (2000).
186. Singh, S. et al. Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathol* **125**, 595–608 (2013).
187. Vogel, D. Y. et al. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflammation* **10**, 809 (2013).
188. Lier, J., Streit, W. J. & Bechmann, I. Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells* **10**, 2236 (2021).

189. Olcum, M., Tastan, B., Kiser, C., Genc, S. & Genc, K. Microglial NLRP3 inflammasome activation in multiple sclerosis. in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* vol. 119 247–308 (Elsevier, 2020).
190. Inoue, M. et al. Interferon- $\beta$  therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome. *Sci Signal* **5**, ra38 (2012).
191. Shao, S. et al. Therapeutic potential of the target on NLRP3 inflammasome in multiple sclerosis. *Pharmacology & Therapeutics* **227**, 107880 (2021).
192. Gris, D. et al. NLRP3 Plays a Critical Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Mediating Th1 and Th17 Responses. *The Journal of Immunology* **185**, 974–981 (2010).
193. Desu, H. L. et al. IC100: a novel anti-ASC monoclonal antibody improves functional outcomes in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* **17**, 143 (2020).
194. Huang, X.-T. et al. Galectin-1 ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via AMPK-Nrf2 pathway in mice. *Free Radical Biology and Medicine* **146**, 222–233 (2020).
195. Sc, S. et al. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity* **37**, (2012).
196. Toscano, M. A. et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* **8**, 825–834 (2007).
197. Rabinovich, G. A., Di Lella, S., Estrin, D. A., Carmelo, J. J. & Méndez-Huergo, S. P. GAL-1 variants having immuno-modulating properties and methods of using the same. (2016).
198. Thiemann, S. & Baum, L. G. Galectins and Immune Responses—Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 243–264 (2016).
199. Méndez-Huergo, S. P., Blidner, A. G. & Rabinovich, G. A. Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. *Current Opinion in Immunology* **45**, 8–15 (2017).
200. Croci, D. O. et al. Glycosylation-Dependent Lectin-Receptor Interactions Preserve Angiogenesis in Anti-VEGF Refractory Tumors. *Cell* **156**, 744–758 (2014).
201. Bonzi, J. et al. Pre-B cell receptor binding to galectin-1 modifies galectin-1/carbohydrate affinity to modulate specific galectin-1/glycan lattice interactions. *Nat Commun* **6**, 6194 (2015).
202. de la Fuente, H. et al. The Leukocyte Activation Receptor CD69 Controls T Cell Differentiation through Its Interaction with Galectin-1. *Molecular and Cellular Biology* **34**, 2479–2487 (2014).
203. Fuentes, M. B. et al. Regulated expression of galectin-1 during T-cell activation involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase and p70<sup>S6</sup> kinase. *Mol Cell Biochem* **267**, 177–185 (2004).
204. Zuñiga, E., Rabinovich, G. A., Iglesias, M. M. & Gruppi, A. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J Leukoc Biol* **70**, 73–79 (2001).

205. Ilarregui, J. M. et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* **10**, 981–991 (2009).
206. Rutkowski, M. R. et al. Microbially Driven TLR5-Dependent Signaling Governs Distal Malignant Progression through Tumor-Promoting Inflammation. *Cancer Cell* **27**, 27–40 (2015).
207. Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F. & Kiss, R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* **16**, 137R-157R (2006).
208. Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Ballan, E., Gabius, H.-J. & Kloog, Y. Galectin-1 Augments Ras Activation and Diverts Ras Signals to Raf-1 at the Expense of Phosphoinositide 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 37169–37175 (2002).
209. Cooper, D., Norling, L. V. & Perretti, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. *Journal of Leukocyte Biology* **83**, 1459–1466 (2008).
210. Iqbal, A. J. et al. Endogenous Galectin-1 and Acute Inflammation. *The American Journal of Pathology* **178**, 1201–1209 (2011).
211. Correa, S. G. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology* **13**, 119–128 (2003).
212. Thiemann, S., Man, J. H., Chang, M. H., Lee, B. & Baum, L. G. Galectin-1 Regulates Tissue Exit of Specific Dendritic Cell Populations. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 22662–22677 (2015).
213. Wang, J. et al. Cross-Linking of GM1 Ganglioside by Galectin-1 Mediates Regulatory T Cell Activity Involving TRPC5 Channel Activation: Possible Role in Suppressing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **182**, 4036–4045 (2009).
214. Tabrizi, S. J. et al. T Cell Leukemia/Lymphoma 1 and Galectin-1 Regulate Survival/Cell Death Pathways in Human Naive and IgM+ Memory B Cells through Altering Balances in Bcl-2 Family Proteins. *The Journal of Immunology* **182**, 1490–1499 (2009).
215. Anginot, A., Espeli, M., Chasson, L., Mancini, S. J. C. & Schiff, C. Galectin 1 Modulates Plasma Cell Homeostasis and Regulates the Humoral Immune Response. *The Journal of Immunology* **190**, 5526–5533 (2013).
216. Rabinovich, G. A., Sotomayor, C. E., Riera, C. M., Bianco, I. & Correa, S. G. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1331–1339 (2000).
217. La, M. et al. A Novel Biological Activity for Galectin-1. *The American Journal of Pathology* **163**, 1505–1515 (2003).
218. Iqbal, A. J. et al. Endogenous Galectin-1 Exerts Tonic Inhibition on Experimental Arthritis. *The Journal of Immunology* **191**, 171–177 (2013).
219. Toscano, M. A. et al. Galectin-1 Suppresses Autoimmune Retinal Disease by Promoting Concomitant Th2- and T Regulatory-Mediated Anti-Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology* **176**, 6323–6332 (2006).
220. Santucci, L. et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* **124**, 1381–1394 (2003).

221. Rubinstein, N. *et al.* Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection. *Cancer Cell* **5**, 241–251 (2004).
222. Cedeno-Laurent, F. *et al.* Metabolic inhibition of galectin-1-binding carbohydrates accentuates antitumor immunity. *J Invest Dermatol* **132**, 410–420 (2012).
223. Huang, X.-T. *et al.* Galectin-1 ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via AMPK-Nrf2 pathway in mice. *Free Radical Biology and Medicine* **146**, 222–233 (2020).
224. Fan, J. *et al.* Galectin-1 attenuates cardiomyocyte hypertrophy through splice-variant specific modulation of CaV1.2 calcium channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1865**, 218–229 (2019).
225. Hill, M. *et al.* The intracellular cation channel TMEM176B as a dual immunoregulator. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **10**, (2022).
226. Sun, P.-H., Xia, S., Yuan, R., Zhang, B. & Wang, G. TMEM176B Promotes EMT via FGFR/JNK Signalling in Development and Tumourigenesis of Lung Adenocarcinoma. *Cancers* **16**, 2447 (2024).
227. Louvet, C. *et al.* Identification of a New Member of the CD20/Fc $\epsilon$ RI $\beta$  Family Overexpressed in Tolerated Allografts. *American Journal of Transplantation* **5**, 2143–2153 (2005).
228. Segovia, M. *et al.* Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am J Transplant* **14**, 1021–1031 (2014).
229. Eon Kuek, L., Leffler, M., Mackay, G. A. & Hulett, M. D. The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. *Immunol Cell Biol* **94**, 11–23 (2016).
230. Mattiola, I., Mantovani, A. & Locati, M. The tetraspan MS4A family in homeostasis, immunity, and disease. *Trends in Immunology* **42**, 764–781 (2021).
231. Condamine, T. *et al.* Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* **88**, 507–515 (2010).
232. Cuajungco, M. P. *et al.* Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochemica* **114**, 705–712 (2012).
233. Melchior, B. *et al.* Dual Induction of TREM2 and Tolerance-Related Transcript, Tmem176b, in Amyloid Transgenic Mice: Implications for Vaccine-Based Therapies for Alzheimer's Disease. *ASN Neuro* **2**, AN20100010 (2010).
234. Hammond, T. R. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity* **50**, 253–271.e6 (2019).
235. Drujont, L. *et al.* ROR $\gamma$ +
236. Ciofani, M. *et al.* A Validated Regulatory Network for Th17 Cell Specification. *Cell* **151**, 289–303 (2012).
237. Lancien, M. *et al.* Dendritic Cells Require TMEM176A/B Ion Channels for Optimal MHC Class II Antigen Presentation to Naive CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology* **207**, 421–435 (2021).

238. Hill, M. *et al.* Immunoresponsive methods of treating tumors. (2020). Patent: EP3618830A1 URL: <https://patents.google.com/patent/EP3618830A1/en>
239. Victoria, S. *et al.* Formulating a TMEM176B blocker in chitosan nanoparticles uncouples its paradoxical roles in innate and adaptive antitumoral immunity. *International Journal of Biological Macromolecules* **279**, 135327 (2024).
240. Hill, M. *et al.* Means and methods for improving anti-tumoral efficacy of transmembrane channel protein blockers. (2022). Patent: CA3222162A1 URL: <https://patents.google.com/patent/CA3222162A1/en?oq=CA3222162A1>
241. Sun, L., Zhang, Y. & Zhang, C. Distinct expression and prognostic value of MS4A in gastric cancer. *Open Medicine* **13**, 178–188 (2018).
242. Liu, Z. *et al.* Potential targets of TMEM176A in the growth of glioblastoma cells. *OTT Volume* **11**, 7763–7775 (2018).
243. Kang, C. *et al.* TMEM176B Regulates AKT/mTOR Signaling and Tumor Growth in Triple-Negative Breast Cancer. *Cells* **10**, 3430 (2021).
244. Galliussi, G. *et al.* Activation of the immunoregulatory cation channel TMEM176B by a nitroalkene derivative of Salicylate prolongs graft survival. *Transplantation* (2025).
245. Cao, S. *et al.* Identification of genetic profile and biomarkers involved in acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* **50**, 46–55 (2024).
246. Pekayvaz, K. *et al.* Protective immune trajectories in early viral containment of non-pneumonic SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* **13**, 1018 (2022).
247. Wang, Z. & Zhao, H. TMEM176B Prevents and alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting transforming growth factor  $\beta$ -Smad signaling. *Helix* **10**, e35444 (2024).
248. Wysocki, T. & Paradowska-Gorycka, A. Pharmacogenomics of Anti-TNF Treatment Response Marks a New Era of Tailored Rheumatoid Arthritis Therapy. *IJMS* **23**, 2366 (2022).
249. He, Y. *et al.* Abnormal Changes of Monocyte Subsets in Patients With Sjögren's Syndrome. *Front. Immunol.* **13**, 864920 (2022).
250. Nickles, D. *et al.* Blood RNA profiling in a large cohort of multiple sclerosis patients and healthy controls. *Hum Mol Genet* **22**, 4194–4205 (2013).
251. Umeton, R. *et al.* Multiple sclerosis genetic and non-genetic factors interact through the transient transcriptome. *Sci Rep* **12**, 7536 (2022).
252. Cambui, R. A. G. *et al.* The Ala134Thr variant in TMEM176B exerts a beneficial role in colorectal cancer prognosis by increasing NLRP3 inflammasome activation. *J Cancer Res Clin Oncol* <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04284-8> (2022) doi:10.1007/s00432-022-04284-8.
253. Comabella, M. *et al.* A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* **132**, 3353–3365 (2009).
254. Wiedrick, J. *et al.* Sex differences in EAE reveal common and distinct cellular and molecular components. *Cell Immunol* **359**, 104242 (2021).
255. Melamed, E., Palmer, J. L. & Fonken, C. Advantages and limitations of experimental autoimmune encephalomyelitis in breaking down the role of the gut microbiome in multiple sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* **15**, (2022).

256. Berer, K. *et al.* Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* **479**, 538–541 (2011).
257. Cekanaviciute, E. *et al.* Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 10713–10718 (2017).
258. Miyauchi, E. *et al.* Gut microorganisms act together to exacerbate inflammation in spinal cords. *Nature* **585**, 102–106 (2020).
259. Cavalli, G. *et al.* Interleukin-1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol* **2**, e325–e331 (2020).
260. Marshall, J. C. *et al.* A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *The Lancet Infectious Diseases* **20**, e192–e197 (2020).
261. Won, J. *et al.* Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp Neurobiol* **29**, 107–119 (2020).
262. Pannunzio, Bruno. Efecto neuroprotector de la activación de la vía CD200-CD200R en la lesión medular por contusión. (Universidad de la República. Facultad de Ciencias - PEDECIBA, Uruguay, 2018).
263. Liao, M. *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med* **26**, 842–844 (2020).
264. Zhou, Y. *et al.* Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *National Science Review* **7**, 998–1002 (2020).
265. Wen, W. *et al.* Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *Cell Discov* **6**, 31 (2020).
266. Nieto-Torres, J. L. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* **485**, 330–339 (2015).
267. Cabrera-Garcia, D., Bekdash, R., Abbott, G. W., Yazawa, M. & Harrison, N. L. The envelope protein of SARS-CoV-2 increases intra-Golgi pH and forms a cation channel that is regulated by pH. *J Physiol* **599**, 2851–2868 (2021).
268. Camell, C. D. *et al.* Senolytics reduce coronavirus-related mortality in old mice. *Science* eabe4832 (2021) doi:10.1126/science.abe4832.
269. Grabherr, S., Ludewig, B. & Pikor, N. B. Insights into coronavirus immunity taught by the murine coronavirus. *Eur. J. Immunol.* **51**, 1062–1070 (2021).
270. Lee, S., Channappanavar, R. & Kanneganti, T.-D. Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. *Trends in Immunology* S1471490620302349 (2020) doi:10.1016/j.it.2020.10.005.
271. Sariol, A. & Perlman, S. Lessons for COVID-19 Immunity from Other Coronavirus Infections. *Immunity* **53**, 248–263 (2020).
272. Zheng, M. *et al.* TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat Immunol* <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00937-x> (2021) doi:10.1038/s41590-021-00937-x.

273. Ryu, S. *et al.* Ketogenic diet restrains aging-induced exacerbation of coronavirus infection in mice. *eLife* **10**, e66522 (2021).
274. Zheng, M. *et al.* Impaired NLRP3 inflammasome activation/pyroptosis leads to robust inflammatory cell death via caspase-8/RIPK3 during coronavirus infection. *J. Biol. Chem.* **295**, 14040–14052 (2020).
275. Zhou, T. *et al.* IL-18BP is a secreted immune checkpoint and barrier to IL-18 immunotherapy. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2422-6> (2020) doi:10.1038/s41586-020-2422-6.
276. Chen, Z. & John Wherry, E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol* **20**, 529–536 (2020).
277. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
278. McClain, M. T. *et al.* Dysregulated transcriptional responses to SARS-CoV-2 in the periphery. *Nat Commun* **12**, 1079 (2021).
279. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* **15**, 486–499 (2015).
280. Alfei, F. *et al.* TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature* **571**, 265–269 (2019).
281. Khan, O. *et al.* TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature* **571**, 211–218 (2019).
282. Scott, A. C. *et al.* TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature* **571**, 270–274 (2019).
283. Sekine, T. *et al.* TOX is expressed by exhausted and polyfunctional human effector memory CD8+ T cells. *Sci. Immunol.* **5**, eaba7918 (2020).
284. Bordon, Y. TOX for tired T cells. *Nat Rev Immunol* **19**, 476–476 (2019).
285. Lee, J., Ahn, E., Kissick, H. T. & Ahmed, R. Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway. *For Immunopathol Dis Therap* **6**, 7–17 (2015).
286. Codo, A. C. *et al.* Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 $\alpha$ /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metabolism* **32**, 437–446.e5 (2020).
287. Gao, C., Jiang, J., Tan, Y. & Chen, S. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 359 (2023).
288. Demirci, S., Demirci, S., Kutluhan, S., Koyuncuoglu, H. R. & Yurekli, V. A. The clinical significance of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in multiple sclerosis. *International Journal of Neuroscience* 1–7 (2015) doi:10.3109/00207454.2015.1050492.
289. Duhalde Vega, M. *et al.* PD-1/PD-L1 blockade abrogates a dysfunctional innate-adaptive immune axis in critical  $\beta$ -coronavirus disease. *Sci. Adv.* **8**, eabn6545 (2022).
290. Giles, J. R., Globig, A.-M., Kaech, S. M. & Wherry, E. J. CD8+ T cells in the cancer-immunity cycle. *Immunity* **56**, 2231–2253 (2023).
291. Abdelsamed, H. A. *et al.* Beta cell-specific CD8+ T cells maintain stem cell memory-associated epigenetic programs during type 1 diabetes. *Nat Immunol* **21**, 578–587 (2020).

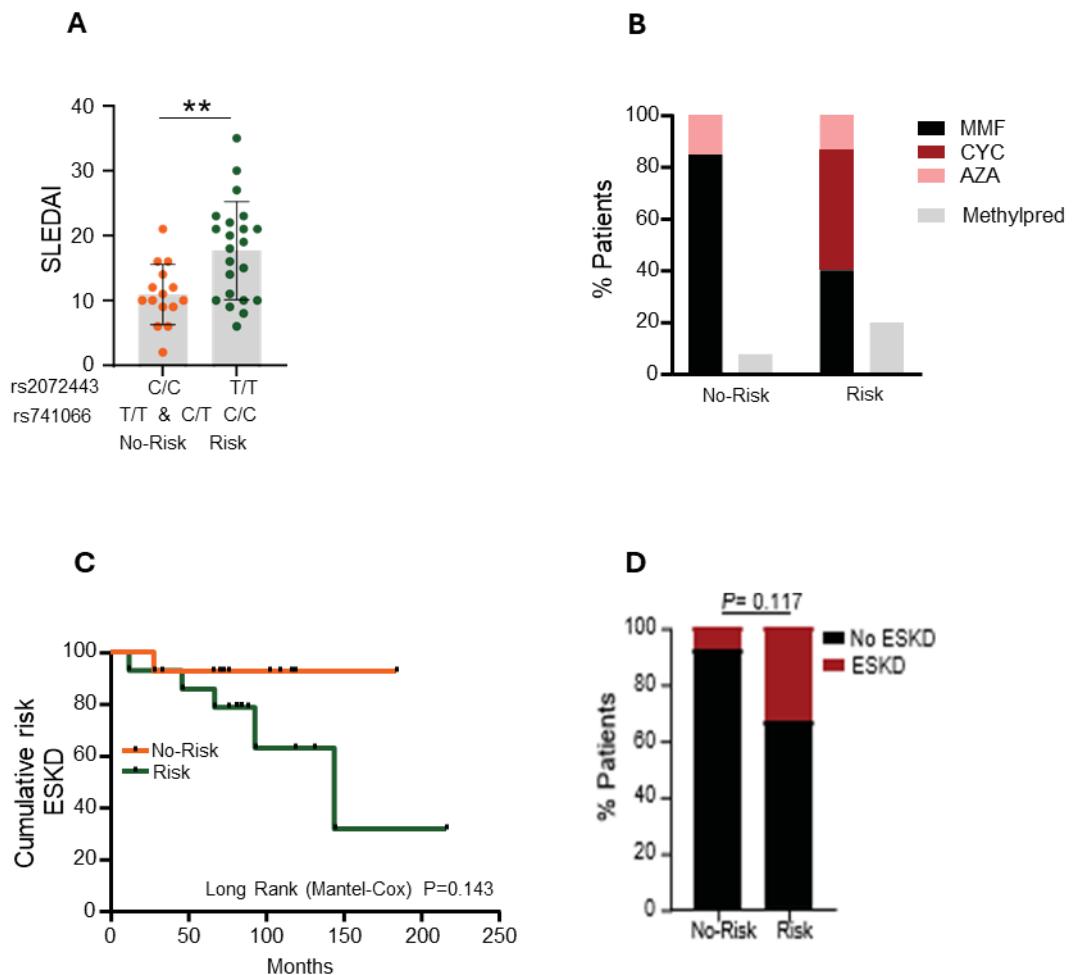
292. Fan, J. *et al.* Galectin-1 attenuates cardiomyocyte hypertrophy through splice-variant specific modulation of CaV1.2 calcium channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1865**, 218–229 (2019).
293. Shang, C. *et al.* Functional evaluation of *TMEM176B* and its predictive role for severe respiratory viral infection through integrated analysis of single-cell and bulk RNA-sequencing. *Journal of Medical Virology* **96**, (2024).
294. Grabherr, S., Ludewig, B. & Pikor, N. B. Insights into coronavirus immunity taught by the murine coronavirus. *Eur J Immunol* **51**, 1062–1070 (2021).
295. Jiang, R.-D. *et al.* Pathogenesis of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Cell* **182**, 50-58.e8 (2020).
296. Gupta, A. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med* **26**, 1017–1032 (2020).
297. Nakamori, Y., Park, E. J. & Shimaoka, M. Immune Deregulation in Sepsis and Septic Shock: Reversing Immune Paralysis by Targeting PD-1/PD-L1 Pathway. *Front. Immunol.* **11**, (2021).
298. Chang, K. *et al.* Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit Care* **18**, (2014).
299. Guinault, D. *et al.* Expression of Exhaustion Markers on CD8+ T-Cell Patterns Predict Outcomes in Septic Patients Admitted to the ICU\*. *Critical Care Medicine* **49**, 1513–1523 (2021).
300. Song, J.-W. *et al.* Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Nat Commun* **11**, (2020).
301. De Biasi, S. *et al.* Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun* **11**, (2020).
302. Diao, B. *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* **11**, (2020).
303. Zhang, J.-Y. *et al.* Single-cell landscape of immunological responses in patients with COVID-19. *Nat Immunol* **21**, 1107–1118 (2020).
304. Liu, C. *et al.* Time-resolved systems immunology reveals a late juncture linked to fatal COVID-19. *Cell* **184**, 1836-1857.e22 (2021).
305. Ahn, E. *et al.* Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, 4749–4754 (2018).
306. Kusnadi, A. *et al.* Severely ill patients with COVID-19 display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. *Sci. Immunol.* **6**, (2021).
307. Yatim, N. *et al.* Immune checkpoint inhibitors increase T cell immunity during SARS-CoV-2 infection. *Sci. Adv.* **7**, (2021).
308. Albiges, L. *et al.* Determinants of the outcomes of patients with cancer infected with SARS-CoV-2: results from the Gustave Roussy cohort. *Nat Cancer* **1**, 965–975 (2020).
309. Aldea, M., Michot, J.-M., Danlos, F.-X., Ribas, A. & Soria, J.-C. Repurposing of Anticancer Drugs Expands Possibilities for Antiviral and Anti-Inflammatory Discovery in COVID-19. *Cancer Discovery* **11**, 1336–1344 (2021).

310. Ceschi, A., Noseda, R., Palin, K. & Verhamme, K. Immune Checkpoint Inhibitor-Related Cytokine Release Syndrome: Analysis of WHO Global Pharmacovigilance Database. *Front. Pharmacol.* **11**, (2020).
311. Wang, P.-F. et al. Immune-Related Adverse Events Associated with Anti-PD-1/PD-L1 Treatment for Malignancies: A Meta-Analysis. *Front. Pharmacol.* **8**, (2017).
312. Hotchkiss, R. S. et al. Immune checkpoint inhibition in sepsis: a Phase 1b randomized study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of nivolumab. *Intensive Care Med* **45**, 1360–1371 (2019).
313. Elhazmi, A. et al. Tocilizumab Outcomes in Critically Ill COVID-19 Patients Admitted to the ICU and the Role of Non-Tocilizumab COVID-19-Specific Medical Therapeutics. *JCM* **12**, 2301 (2023).
314. Tharaux, P.-L. et al. Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): a randomised controlled trial. *The Lancet Respiratory Medicine* **9**, 295–304 (2021).
315. McKenzie, B. A. et al. Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, (2018).
316. Wang, Y. et al. IRAK-M suppresses the activation of microglial NLRP3 inflammasome and GSDMD-mediated pyroptosis through inhibiting IRAK1 phosphorylation during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Death Dis* **14**, (2023).
317. Mildner, A. et al. CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain* **132**, 2487–2500 (2009).
318. Vainchtein, I. D. et al. In acute experimental autoimmune encephalomyelitis, infiltrating macrophages are immune activated, whereas microglia remain immune suppressed. *Glia* **62**, 1724–1735 (2014).
319. Paré, A. et al. IL-1 $\beta$  enables CNS access to CCR2<sup>hi</sup> monocytes and the generation of pathogenic cells through GM-CSF released by CNS endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, (2018).
320. Lévesque, S. A. et al. Myeloid cell transmigration across the CNS vasculature triggers IL-1 $\beta$ -driven neuroinflammation during autoimmune encephalomyelitis in mice. *Journal of Experimental Medicine* **213**, 929–949 (2016).
321. Crozat, K. et al. Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8a+ Type. *The Journal of Immunology* **187**, 4411–4415 (2011).
322. Inoue, M., Williams, K. L., Gunn, M. D. & Shinohara, M. L. NLRP3 inflammasome induces chemotactic immune cell migration to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 10480–10485 (2012).
323. Miller, S. D. & Karpus, W. J. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *CP in Immunology* **77**, (2007).
324. Barclay, W. & Shinohara, M. L. Inflammasome activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis ( EAE ). *Brain Pathology* **27**, 213–219 (2017).
325. Ronchi, F. et al. Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1 $\beta$  production by myeloid cells. *Nat Commun* **7**, 11541 (2016).

326. Furtado, G. C. *et al.* Swift Entry of Myelin-Specific T Lymphocytes into the Central Nervous System in Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **181**, 4648–4655 (2008).
327. Tostanoski, L. H. *et al.* Reprogramming the Local Lymph Node Microenvironment Promotes Tolerance that Is Systemic and Antigen Specific. *Cell Reports* **16**, 2940–2952 (2016).
328. Mockus, T. E., Munie, A., Atkinson, J. R. & Segal, B. M. Encephalitogenic and Regulatory CD8 T Cells in Multiple Sclerosis and Its Animal Models. *The Journal of Immunology* **206**, 3–10 (2021).
329. Vartanian, T., Li, Y., Zhao, M. & Stefansson, K. Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* **1**, 732–743 (1995).
330. Huseby, E. S. *et al.* A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* **194**, 669–676 (2001).
331. Sun, D. *et al.* Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* **166**, 7579–7587 (2001).
332. McKinney, E. F., Lee, J. C., Jayne, D. R. W., Lyons, P. A. & Smith, K. G. C. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature* **523**, 612–616 (2015).
333. Grebinoski, S. *et al.* Autoreactive CD8+ T cells are restrained by an exhaustion-like program that is maintained by LAG3. *Nat Immunol* **23**, 868–877 (2022).
334. Page, N. *et al.* Expression of the DNA-Binding Factor TOX Promotes the Encephalitogenic Potential of Microbe-Induced Autoreactive CD8+ T Cells. *Immunity* **48**, 937–950.e8 (2018).
335. Page, N. *et al.* Persistence of self-reactive CD8+ T cells in the CNS requires TOX-dependent chromatin remodeling. *Nat Commun* **12**, 1009 (2021).
336. Rostami, A. & Ceric, B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *Journal of the Neurological Sciences* **333**, 76–87 (2013).
337. Kebir, H. *et al.* Preferential recruitment of interferon- $\gamma$ -expressing T<sub>H</sub>17 cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* **66**, 390–402 (2009).
338. Van Langelaar, J. *et al.* T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain* **141**, 1334–1349 (2018).
339. Durelli, L. *et al.* T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon- $\beta$ . *Annals of Neurology* **65**, 499–509 (2009).
340. Wu, B. & Wan, Y. Molecular control of pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. *International Immunopharmacology* **80**, 106187 (2020).
341. McGinley, A. M. *et al.* Interleukin-17A Serves a Priming Role in Autoimmunity by Recruiting IL-1 $\beta$ -Producing Myeloid Cells that Promote Pathogenic T Cells. *Immunity* **52**, 342–356.e6 (2020).
342. Martin, B. N. *et al.* T cell-intrinsic ASC critically promotes TH17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Immunol* **17**, 583–592 (2016).

343. Zhang, Q. *et al.* TH17 cells promote CNS inflammation by sensing danger signals via Mincle. *Nat Commun* **13**, (2022).
344. Greer, P. L. *et al.* A Family of non-GPCR Chemosensors Defines an Alternative Logic for Mammalian Olfaction. *Cell* **165**, 1734–1748 (2016).
345. Cagnoni, A. J. *et al.* Galectin-1 fosters an immunosuppressive microenvironment in colorectal cancer by reprogramming CD8<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**, (2021).
346. Maybruck, B. T., Pfannenstiel, L. W., Diaz-Montero, M. & Gastman, B. R. Tumor-derived exosomes induce CD8+ T cell suppressors. *j. immunotherapy cancer* **5**, (2017).
347. Moreau, A. *et al.* Absence of Galectin-1 accelerates CD8+ T cell-mediated graft rejection. *Eur J Immunol* **42**, 2881–2888 (2012).

## Anexo 1



**Figura S1.** Las variantes genéticas rs741066 de TMEM17A y rs2072443 de TMEM17B están asociadas con una enfermedad general más severa y un peor pronóstico en la nefritis lúpica.

(A) Se muestra el SLEDAI (Índice de Actividad de la Enfermedad en Lupus Eritematoso Sistémico) basal en pacientes portadores de los alelos de riesgo o no riesgo, rs741066 para TMEM17A y rs2072443 para TMEM17B. La desviación estándar está indicada. X2 test \*\*p<0.01

(B) Porcentaje de pacientes que recibieron los tratamientos indicados para la inducción a la remisión. (MMF = Micofenolato mofetilo; CYC = ciclofosfamida; AZA = azatioprina; Methylpred = bolo de metilprednisolona). (C) Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión hacia enfermedad renal terminal (ESKD) en pacientes con LES portadores de alelos protectores o de riesgo. Long Rank (Mantel-Cox) P=0.143. (D) Porcentaje de pacientes con nefritis lúpica que desarrollaron enfermedad renal terminal.

## Anexo 2. Producción científica asociada a la tesis

### 1. Publicaciones directamente asociadas a la tesis

#### **“PD-1/PD-L1 blockade abrogates a dysfunctional innate-adaptive immune axis in critical β-coronavirus disease”**

Duhalde Vega M\*, Olivera D\*, Gastão Davanzo G\*, Bertullo M, Noya V, Fabiano de Souza G, Primon Muraro S, Castro I, Arévalo AP, Crispo M, Galliussi G, Russo S, Charbonnier D, Rammauro F, Jeldres M, Alamón C, Varela V, Batthyany C, Bollati-Fogolín M, Oppezzo P, Pritsch O, Proença-Módena JL, Nakaya HI, Trias E, Barbeito L, Anegon I, Cuturi MC, Moraes Vieira P, Segovia M y Hill M.

*Science Advances*, 2022. DOI: 10.1126/sciadv.abn6545. Revista arbitrada. \*Co-primeros autores

#### **“The intracellular cation channel TMEM176B as a dual immunoregulator”**

Hill M., Russo S., Olivera D, Malcuori M, Galliussi G, Segovia M.

*Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022. 10:1038429.  
DOI:10.3389/fcell.2022.1038429

### 2. Otras publicaciones durante el período doctoral

#### **“Formulating a TMEM176B blocker in nanoparticles uncouples its paradoxical roles in innate and adaptive antitumoral immunity.”**

Victoria S\*, Castro A\*, Pittini A, Olivera D, Russo S, Cebrian I, Mombru A, Osinaga E, Pardo H, Segovia M, Hill M. \*Co-primeros autores.

*International Journal of Biological Macromolecules*, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135327>

### **3. Presentaciones en congresos**

#### **“Targeting TMEM176B controls inflammasome-dependent T cell dysfunction in coronavirus infection”**

Maite Duhalde Vega, Daniela Olivera, Gustavo Davanzo, Mauricio Bertullo, Verónica Noya, Ana Paula Arévalo, Martina Crispó, Germán Galliussi, Sofía Russo, Mathías Jeldres, Catalina Alamón, Valentina Varela, Carlos Batthyany, Mariela Bollati-Fogolin, Pablo Oppezzo, Emiliano Trias, Luis Barbeito, Ignacio Anegón, Pedro Moraes Vieira, María Cristina Cuturi, Mercedes Segovia, Marcelo Hill.

Presentó: Daniela Olivera, formato poster

Evento: FOCIS Annual Meeting (2021)

Lugar: Estados unidos (Asistencia Virtual)

#### **“The cation channel TMEM176B as a protective factor in autoimmune encephalomyelitis”**

Daniela Olivera, Antonella D’Anatro, Bruno Pannunzio, Juan Manuel Pérez-Sáez, Florencia Veigas, Ignacio Anegón, Natalia Lago, Gabriel A. Rabinovich, Marcelo Hill y Mercedes Segovia

Presentó: Daniela Olivera, exposición oral

Evento: FOCIS Annual Meeting (2023)

Lugar: Boston, MA, Estados Unidos

#### **“Targeting an endogenous inflammasome inhibitor in inflammatory diseases”**

Presentó: Daniela Olivera, exposición oral por invitación

Evento: Latin-American Immunology Symposium - FOCIS Anual Meeting (2023)

Lugar: Boston, MA, Estados Unidos

**“The cation channel TMEM176B is a druggable protective factor in autoimmune disease”**

Daniela Olivera, Antonella D’Anatro, Bruno Pannunzio, Juan Manuel Pérez-Sáez, Florencia Veigas, David Charbonnier, Daniela Velázquez, Ignacio Anegón, Natalia Lago, Florencia Rossetti, Gabriel A. Rabinovich, Marcelo Hill y Mercedes Segovia

Presentó: Daniela Olivera, exposición oral

Evento: Encuentro anual ALACI (2024)

Lugar: Buenos Aires, Argentina

**“The cation channel TMEM176B is a druggable protective factor in autoimmune encephalomyelitis”**

Daniela Olivera, Antonella D’Anatro, Bruno Pannunzio, Juan Manuel Pérez-Sáez, Florencia Veigas, David Charbonnier, Daniela Velázquez, Ignacio Anegón, Natalia Lago, Florencia Rossetti, Gabriel A. Rabinovich, Marcelo Hill y Mercedes Segovia

Presentó: Daniela Olivera, exposición oral por invitación

Evento: Latin-American Immunology Symposium - FOCIS Anual Meeting (2025)

Lugar: Boston, MA, Estados Unidos

#### **4. Contribuciones tecnológicas e invenciones**

##### **Declaración de invención**

**Título:** “4-Phenyl- and 4-Pyridyl-substituted Dihydropyridines and Deuterated Analogs Thereof and Methods for Making and Using the Same”

**Inventores:** Marcelo Hill, Pablo Oppezzo, María Inés Varela Vega, Marianela Leporati, Sofía Russo, Daniela Olivera, Mercedes Segovia

**Instituciones participantes:** Ardan Pharma; Institut Pasteur de Montevideo

**Año:** 2025

## 5. Formación de estudiantes

### Dirección de tesis de grado

**Tesista:** Antonella D'Anatro (Universidad ORT, 2024)

**Título:** Empleo de técnicas histológicas para la caracterización de TMEM176B como modulador inmunológico en la Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE) y potencial target farmacológico

**Rol:** Directora

**Institución:** Laboratorio de Inmunorregulación e Inflamación, Institut Pasteur de Montevideo

## 6. Reconocimientos

### FOCIS Centers of Excellence Award

*Por el trabajo:*

*"Targeting TMEM176B controls inflammasome-dependent T cell dysfunction in coronavirus infection"*

(Federation of Clinical Immunology Societies, 2021)

### FOCIS Clinical Immunology Award

*Por el trabajo:*

*"The cation channel TMEM176B as a protective factor in autoimmune encephalomyelitis"*

(Federation of Clinical Immunology Societies, 2023)