UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Crosstalk entre plaquetas, Brucella abortus y células inmunes:

su rol en la infección y la inmunopatología de la brucelosis humana

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Aldana Trotta

Directora de Tesis: **Dra. Paula Barrionuevo**

Consejera de Estudios: **Dra. Rosanna Ramhorst**

Lugar de Trabajo: **Instituto de Medicina Experimental, (CONICET – ANM)**

Fecha de Defensa: **4 de marzo de 2021**

Buenos Aires, 2021

"*Most people say that it is the intellect which makes a great scientist.*

They are wrong: it is character."

Albert Einstein

Agradecimientos

Todos los que me conocen saben que, si bien digo todo lo que pienso, en general nunca digo todo lo que siento. Por ende, saben lo difícil que me resulta esta parte…

A **Pau**, por presentarme el fascinante mundo de la inmunología, allá por 2011. Por confiar siempre en mí y abrirme las puertas del labo, dándome todo el espacio para crecer. Por brindarme siempre la libertad de decidir y perseguir mis propios objetivos. Por ser un ejemplo de integridad y compañerismo, de amor y diversión. Por ser mucho más que mi directora y acompañarme más allá de lo laboral.

A **Lis**, **Aye** y **Agus**, por la compañía, el apoyo y la ayuda de siempre.

A todos los **chicos del lab**, por ponerle esa cuota de humor a los días que hace que todo sea más llevadero. Por sacarme esa sonrisa en el momento en el que más lo necesito. A **Gabi** y **Verito**, por estar siempre para responder mis interminables dudas, para discutir resultados, para ayudar a pensar un experimento o revolver una heladera para recuperar algún reactivo olvidado por ahí. A **Luigi** y **Fede**, por ser ese apoyo constante en las largas tardes de experimentos, los cursos y los findes, por esas birras para festejar o para ahogar penas. Estos años no hubiesen sido los mismos sin uds a mi lado y lo saben

A **Fede Fuentes**, por ser el mejor confocalista que podríamos pedir. Esta tesis no hubiese sido lo mismo sin tu ayuda y la buena onda durante todas las horas que compartimos.

A toda la gente de la Academia Nacional de Medicina, por el apoyo brindado a lo largo de todos estos años, los mates compartidos, las charlas y los consejos. En especial al grupo de la Dra. Mirta Schattner por estar siempre dispuestos a darnos una mano y por la buena onda que los caracteriza.

A **Guille**, **Ani**, **Vic** y las chicas del Satz, por todos estos años soportando mis dudas, cuestionamientos y millones de preguntas. Por adoptarme en este último tiempito como miembro transitorio, aunque sea de a ratitos y siempre hacerme sentir más que bienvenida.

A **Jorge** y **Martín**, por ser un ejemplo a seguir, tanto en la docencia como en su compromiso con la ciencia, con los estudiantes y la sociedad en general. Gran parte de lo que soy como docente, lo aprendí de ustedes a lo largo de estos años.

A **Car**, **Fleer** y **Ax**, por ser mi eterno sostén, mi cable a tierra. Por las tardes de mates, las meriendas, las cenas, las clases de cocina, las películas de Disney, las tardes de catarsis. Naaada de todo esto hubiese sido posible sin su apoyo durante estos largos años de camino recorrido juntos.

A **Debo**, por ser la mejor amiga que alguien puede pedir. Por todas sus locuras, las charlas sin sentido, los audios interminables sin principio ni fin. Por su amistad incondicional.

A **Adri**, por el acompañamiento constante. Por aguantarme en todas, buenas, malas y peores. Por ser el mejor compañero de inmuno, a pesar de las picas laborales. Gracias por dejarme compartir la vida con vos.

A **Oscar**, por acompañarme en mis proyectos y planes, aunque no siempre hayan sido claros. Por aceptarme y quererme como a una hija, con mis obsesiones y mi humor particular. Por convertirte en mi sostén y mi guía, en mi faro y en mi modelo a seguir, incluso en algunos errores compartidos. Más allá de todo y de todos, sabes que te quiero y siempre vas a ser como un padre para mi

A **mi vieja**, por ser mi modelo a seguir en la vida. Por ser la primera científica en mi vida, por enseñarme a cultivar la curiosidad y responder mis eternas preguntas desde pequeña. Por acompañarme desde mis inicios en la ciencia, aunque no me hayas querido regalar el juego de química porque “era peligroso”. Por inculcarme siempre el sentido de la responsabilidad, el respeto por el laburo y el amor por la docencia. Gracias por

demostrarme todos los días que todo el esfuerzo que uno hace vale la pena y que uno puede vivir de lo que ama. Gracias por ser quien sos y por hacerme quien soy ¡Te amo!

A mis compañeras más fieles y más dulces, **Indi** y **Brida**.

Nunca voy a encontrar las palabras indicadas para agradecerles todo lo que hicieron, y hacen por mí ¡los quiero con el alma!

Crosstalk entre plaquetas, *Brucella abortus* y células inmunes: su rol en la infección y la inmunopatología de la brucelosis humana

Resumen

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por bacterias del género *Brucella*. Las plaquetas han sido ampliamente descritas como mediadoras de la hemostasia y encargadas de mantener la integridad vascular. Sin embargo, en los últimos años también han sido involucradas en la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa frente a diferentes patógenos. Por este motivo, el objetivo de esta tesis fue investigar el rol de las plaquetas en la respuesta inmune innata frente a *Brucella abortus*.

En primer lugar, nos centramos en estudiar las posibles interacciones entre *B. abortus* y plaquetas. Nuestros resultados demuestran que las bacterias pueden interaccionar directamente con las plaquetas, desencadenando la activación plaquetaria. Más aun, las plaquetas funcionan como *carriers* de las bacterias hacia los monocitos y, en consecuencia, establecen complejos con los monocitos infectados. Además de promover la invasión por *B. abortus*, las plaquetas favorecen la activación de los monocitos, aumentando la secreción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión. La modulación de la expresión de moléculas de adhesión en superficie se encuentra regulada principalmente por factores solubles liberados por las plaquetas infectadas, tales como el sCD40L, PF4, PAF y el Tromboxano A_2.

Por otro lado, demostramos que los pacientes con brucelosis crónica presentan niveles levemente elevados de complejos mixtos plaqueta-monocito y plaqueta-neutrófilo en circulación. En línea con estos resultados, la presencia de plaquetas durante la infección de neutrófilos con *B. abortus* aumenta la secreción de IL-8, la expresión de CD11b y la formación de especies reactivas del oxígeno mientras que disminuye la expresión de CD62L, indicando un estado activado. Mientras que la expresión de CD11b es inducida principalmente por factores solubles liberados por las plaquetas infectadas, el aumento del estallido respiratorio requiere de la interacción directa entre ambas poblaciones celulares. A pesar de que las plaquetas no promueven la invasión inicial de PMN por *B. abortus*, favorecen la contención intra- y extracelular de la infección.

Por último, estudiamos el rol de las plaquetas en la modulación de la extravasación de monocitos y neutrófilos. Nuestros resultados indican que los sobrenadantes recolectados a partir de plaquetas infectadas promueven la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos hacia el sitio de infección. Adicionalmente, la presencia de plaquetas aumenta la activación de células endoteliales HUVEC, HMEC y HBMEC en respuesta a la infección, cuantificada como expresión de CD54 y secreción de IL-8 y MCP-1. Asimismo, demostramos que la inducción de CD54 en superficie se debe a factores solubles liberados por las plaquetas infectadas, que actúan mediante la vía de señalización de Erk1/2. Finalmente, demostramos que los endotelios tratados con estos sobrenadantes permiten la transmigración tanto de monocitos como de neutrófilos, por un mecanismo dependiente de la vía de Erk1/2.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que las plaquetas son capaces de reconocer y reaccionar frente a *B. abortus*. A su vez, las plaquetas pueden interactuar con monocitos y neutrófilos en el contexto de la infección tanto *in vitro* como en sangre de personas infectadas. Esta interacción potencia la capacidad proinflamatoria de monocitos/macrófagos y neutrófilos, lo cual podría promover la resolución de la infección. Por último, las plaquetas también son capaces de activar al endotelio, reclutando y favoreciendo la migración de monocitos y neutrófilos hacia los sitios de infección.

Crosstalk between platelets, *Brucella abortus* and immune cells:

Their role in Brucellosis infection and immunopathology

Abstract

Brucellosis is an infectious disease elicited by bacteria of the genus *Brucella*. Platelets have been extensively described as mediators of hemostasis and as being responsible for maintaining vascular integrity. Nevertheless, they have been recently involved in the modulation of innate and adaptive immune responses. The aim of this study was to investigate the role of platelets in the immune response against *Brucella abortus.*

We first focused on the possible interactions between *B. abortus* and platelets. Our results indicate that bacteria were able to directly interact with platelets, triggering platelet activation. Moreover, platelets established complexes with infected monocytes/macrophages as a result of a carrier function elicited by platelets. Besides promoting the invasion of monocytes/macrophages by *B. abortus*, platelets enhanced the secretion of proinflammatory mediators and the expression of adhesion molecules. We also demonstrate that the modulation of these adhesion molecules was caused by soluble mediators released by *B. abortus*-activated platelets, such as sCD40L, PF4, PAF and thromboxane A2.

Furthermore, we demonstrate that brucellosis patients present slightly elevated levels of platelet-monocyte and platelet-neutrophils complexes in circulation. In line with these results, the presence of platelets during *B. abortus* infection also increased secretion of IL-8, CD11b surface expression and reactive oxygen species formation while decreasing the expression of CD62L, indicating an activated status of these cells. While CD11b expression was induced by platelet's soluble factors, direct contact between cell populations was needed to enhance the respiratory burst. Finally, even though the presence of platelets did not modify the initial invasion of PMN by *B. abortus*, it improved the restraint of the infection both in an intra- and extracellular fashion.

Finally, we studied the role of platelets in the modulation of monocytes and PMN extravasation in the context of *B. abortus*-mediated infection. Our results showed that supernatants collected from *B. abortus-infected* platelets promoted the chemotaxis of monocytes and neutrophils to the site of infection. Additionally, the presence of platelets during the infection enhanced the activation of HUVEC, HMEC and HBMEC cells, measured as CD54 surface expression and secretion of IL-8 and MCP-1. Our results show that CD54 induction was due to soluble factors released by infected platelets which act through the Erk1/2 MAPK pathway. Finally, our results demonstrate that endothelium treated with supernatants derived from infected platelets allowed the transmigration of both monocytes and PMN cells, in an Erk1/2-dependent manner.

Altogether, we have demonstrated that platelets can directly sense and react to *B. abortus* presence and interact with monocytes and polymorphonuclear cells in the context of *in vitro B. abortus* infection as well as in brucellosis patients. Furthermore, these interactions with monocytes/macrophages and neutrophils increase their pro-inflammatory capacity, which could promote the resolution of the infection. Finally, platelets are also

able to activate the endothelium, recruiting and promoting the migration of monocytes and PMN towards the site of the infection.

Parte de los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral dieron lugar a los siguientes trabajos:

1. **Trotta, A**; Velasquez, LN; Milillo, MA; Delpino, MV; Rodríguez, AM; Landoni, VI; Giambartolomei, GH; Pozner, RG; Barrionuevo, P. "*Platelets promote Brucella abortus monocyte invasion by establishing complexes with monocytes*". *Front. Immunol*. *9: 1000* (2018). doi: 10.3389/fimmu.2018.01000.

2. **Trotta, A**. Milillo, MA. Serafino, A. Castillo, LA. Birnberg Weiss, F. Delpino, MV. Giambartolomei, GH. Fernández, GC. Barrionuevo, P. "*Brucella abortus-infected platelets modulate neutrophils activation*". *Immunol Cell Biol*. *98(9): 743-756,* (2020) doi: 10.1111/imcb.12373.

3. Rodríguez, AM*. **Trotta, A***. Melnyczajko, AP. Miraglia, MC. Kim, KS. Delpino, MV. Barrionuevo, P. Giambartolomei, GH. "*Brucella abortus-stimulated platelets activate brain microvascular endothelial cells increasing cell transmigration through Erk1/2*". *Pathogens 9(9): E708,* (2020), doi: 10.3390/pathogens9090708
   *ambas autoras contribuyeron de igual manera a la realización de este trabajo.

Índice

Agradecimientos 3

Abreviaturas 13

Introducción 15

Brucelosis 16

Etiología 16

Epidemiología 17

Fuentes de Infección 19

Sintomatología 20

Diagnóstico y Tratamiento 20

Sistema Inmune 21

Células Endoteliales 22

Monocitos y Macrófagos 23

Células Polimorfonucleares 24

Plaquetas 25

Rol de las Plaquetas en el contexto infeccioso 26

Respuesta Inmune contra *B. abortus* 27

Respuesta Inmune Innata 27

Respuesta Inmune Adaptativa 28

Hipótesis y Objetivos 30

Materiales y Métodos 32

Aspectos Éticos 33

Bacterias 33

Líneas celulares 33

Cultivo Primario de Células 34

Muestras de Sangre 34

Reactivos Utilizados 35

Infecciones *in vitro* 35

Preparación de Sobrenadantes para Estimulación de Cultivos Celulares 35
Ensayos de Microscopía Confocal 35
Recuento de Unidades Formadoras de Colonias 36
Cuantificación de la activación plaquetaria 37
Cuantificación de Complejos en Sangre Entera 37
Citometría de Flujo 38
ELISA 38
Producción de Especies Reactivas de Oxígeno 38
Ensayos de Quimiotaxis 38
Ensayos de Transmigración 38
Análisis Estadístico 39
Resultados Parte I 40
Las plaquetas promueven la infección y establecen complejos con los monocitos infectados 41
Las plaquetas interaccionan directamente con *B. abortus* 44
Las plaquetas funcionan como *carriers* de la bacteria hacia los monocitos 46
Factores solubles liberados por las plaquetas median la modulación de CD54 en monocitos 48
Las plaquetas promueven la invasión de monocitos y favorecen la contención bacteriana 51
Las plaquetas forman complejos con monocitos en sangre entera 52
Los complejos plaqueta-monocito se encuentran elevados en pacientes con brucelosis 53
Resultados Parte II 54
Los complejos plaqueta-PMN también se encuentran elevados en pacientes con brucelosis 55
B. abortus promueve el establecimiento de complejos plaqueta-PMN 57
Las plaquetas promueven la activación de PMN inducida por *B. abortus* 60
La interacción plaqueta-PMN es necesaria para el estallido respiratorio, pero no para la expresión de CD11b en superficie 61
Las plaquetas promueven la contención y eliminación de *B. abortus* por parte de los PMN 63
Resultados Parte III 65
Las plaquetas infectadas liberan quimioatractantes de monocitos y neutrófilos 66
Las plaquetas promueven la activación del endotelio mediada por *B. abortus* 67

Factores secretados por las plaquetas infectadas activan células HBMEC 68

Las plaquetas infectadas promueven la transmigración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica 71

La vía de señalización de Erk1/2 se encuentra involucrada en la transmigración a través de la barrera hematoencefálica 72

La presencia de plaquetas favorece la migración de células mononucleares infectadas a través del endotelio 75

Discusión de Resultados Parte I 77

Discusión de Resultados Parte II 82

Discusión de Resultados Parte III 86

Conclusiones Finales 90

Referencias Bibliográficas 93

Abreviaturas

Acs	Anticuerpos
ADP	Adenosina di-fosfato
7 AAD	7-aminoactinomicina D
Ags	Antígenos
ATP	Adenosina tri-fosfato
Ba	*Brucella abortus*
CD	Cluster Diferentiation
DHR	Dihidroxirodamina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzime-Linked InmunoSorbant Assay
Erk 1/2	Extracellular signal-regulated kinases
FcγR	Receptor de la porción constante de la Inmunoglobulina G
FSC	Forward Scatter
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
HBMEC	Human Brain Microvascular Endothelial Cells
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1
HMEC	Human Microvascular Endothelial Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleuquina
LAMP2	Lysosome-Associated Membrane Protein 2
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen 1
LPS	Lipopolisacárido
Mac-1	Macrophage Antigen 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIF	Media de la Intensidad de Fluorescencia
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
MOI	Multiplicidad de Infección
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NETs	Trampas Extracelulares de Neutrófilos
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NS	No significativo
OMV	Outer Membrane Vesicles
PAF (R)	Platelet Activating Factor (Receptor)
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBS	Solución Buffer de Fosfato
PF	Factor Plaquetario
PLT	Plaquetas
PMA	Phorbol 12-miristato 13-Acetato
PMN	Célula Polimorfo Nuclear

PRP	Plasma Rico en Plaquetas
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrones
PSGL-1	P-Selectin Ligand 1 (CD162)
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted (CCL5)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SD	Desviación estándar
SEM	Error estándar de la media
SSC	Side Scatter
TG	Tiroglobulina
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Th	Respuesta T *helper*
TLR	Toll Like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TREM-1	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1
TXA_2	Tromboxano 2
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VCAM	Vascular Cell Adhesion Protein 1
vWF	von Willebrand Factor
WAMP-1	Vesicle-Associated Membrane Protein 1

Introducción

Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por bacterias del género *Brucella* que afecta tanto al hombre como a animales domésticos, fauna silvestre y mamíferos marinos[1]. Su presencia en humanos está íntimamente relacionada con el contacto con animales domésticos y/o ganado infectado[2].

Esta enfermedad resulta endémica en diversos países en vías de desarrollo, donde representa un problema serio para la salud pública y la ganadería[1–3]. La brucelosis en el ganado promueve la disminución de la capacidad reproductiva, abortos espontáneos, partos de crías débiles y contaminación de lácteos y carnes, generando así importantes pérdidas económicas tanto en la industria agropecuaria como en la salud pública. En nuestro país, se estima que las pérdidas económicas relacionadas con esta enfermedad superan los 60 millones de dólares anuales debido a su alta incidencia[4].

En humanos, esta patología presenta un amplio espectro clínico y se caracteriza por su gran tendencia hacia la cronicidad, asociada a sucesivas recaídas a partir de una forma aguda o manifestaciones focales. Los pacientes infectados con *Brucella* spp. pueden presentar diversos síntomas, que varían según el estadio de la enfermedad y los órganos y sistemas involucrados. La sintomatología más común incluye fiebre continua, intermitente o irregular de duración variable entre 10 y 30 días, cefalea, fatiga, diaforesis, mialgias, pérdida de peso, anorexia y malestar generalizado. Por lo general se suele hallar hepatomegalia (agrandamiento del hígado) y/o esplenomegalia (agrandamiento del bazo) junto con adenopatías (inflamación de los ganglios y/o glándulas)[1,2].

La complicación más común corresponde a la enfermedad osteoarticular, que se puede presentar como artritis, espondilitis, sacroileítis u osteomielitis. El sistema urogenital es el segundo sitio de focalización más común y puede generar orquitis o epididimitis en el hombre. En el caso de las mujeres, la infección por *Brucella* durante el embarazo constituye un importante factor de riesgo de abortos espontáneos. Algunas manifestaciones comunes pueden ser meningitis y astrogliosis (en la cual las bacterias se alojan en el sistema nervioso central), hepatitis granulomatosa y difusa (cuando se alojan a nivel hepático) y endocarditis (a nivel del sistema cardiovascular), entre otras[1,2].

Etiología

Las bacterias del género *Brucella* pertenecen a la clase α-proteobacteria, orden Rhizobiales y familia *Brucellaceae*[5]. Este género está compuesto por cocobacilos Gram negativos pequeños, aerobios estrictos y de crecimiento lento. Si bien estos microorganismos son capaces de sobrevivir en el ambiente durante largos periodos de tiempo, su nicho preferencial es el intracelular[6]. A diferencia de muchos grupos bacterianos, su genoma está compuestos por dos cromosomas circulares y carecen de DNA plasmídico[7], la única excepción dentro del género es la biovariedad 3 de *B. suis* que cuenta con un único cromosoma de gran tamaño[8].

Solamente cuatro de las especies clásicas de *Brucella* son patógenas para el hombre: *B. melitensis, B. abortus, B. suis* y *B. canis*, siendo las tres primeras las responsables de la mayoría de los casos de brucelosis humana[9,10].

Los hospedadores preferenciales y el nivel de patogenicidad en humanos que presentan las especies de *Brucella* se pueden apreciar en la tabla 1.

	ESPECIE	HOSPEDADOR PREFERENCIAL	NIVEL DE PATOGENICIDAD EN HUMANOS
Especies Lisas (S)	*B. melitensis*	Caprinos, ovinos, camélidos	Elevada. Causa más común de brucelosis humana.
	B. abortus	Bovinos, camélidos, búfalos, bisontes	Moderada. Segunda causa más común de brucelosis humana.
	B. suis	Porcinos, jabalíes, renos, caribúes, roedores	Moderada. En ascenso, con cazadores de jabalíes en riesgo.
	B. neotomae	Roedores	No reportada
	B. pinnipedae	Focas, lobos marinos	Moderada. Reportes de manifestaciones complicadas (neurobrucelosis, espondilitis).
	B. cetaceae	Delfines, focénidos	Moderada. Reportes de manifestaciones complicadas (neurobrucelosis, espondilitis).
	B. microti	Roedores salvajes	No reportada
	B. inopinata	Desconocido	Aislada de un caso humano
	B. papionis	Mandriles	No reportada
Desconocido	*B. vulpis*	Zorros rojos	No reportada
Especies Rugosas (R)	*B. ovis*	Ovinos	No reportada
	B. canis	Caninos	Moderada. En ascenso en particular en Sudamérica

Tabla 1: Características de las especies del género *Brucella*[11–13].

Es posible categorizar las especies de *Brucella* de acuerdo al aspecto de las colonias formadas en medio sólido, en lisas (L) o rugosas (R). Esta diferencia de fenotipo se debe a variaciones en la composición química del lipopolisacárido (LPS) expresado en la superficie bacteriana. Resulta importante destacar que existe una correlación entre el tipo de colonia y la virulencia de la cepa, siendo las lisas las más virulentas[14].

Epidemiología

La brucelosis es la zoonosis bacteriana más común a nivel mundial, con alrededor de 500.000 nuevos casos por año[15]. La incidencia y prevalencia de esta enfermedad en humanos varía geográficamente y se encuentra en constante cambio, debido a razones socioeconómicas y políticas, el incremento de viajes de carácter internacional y a medidas sanitarias para su control[16]. En la Figura 1 se presenta un mapa global de la incidencia de la brucelosis en humanos[16].

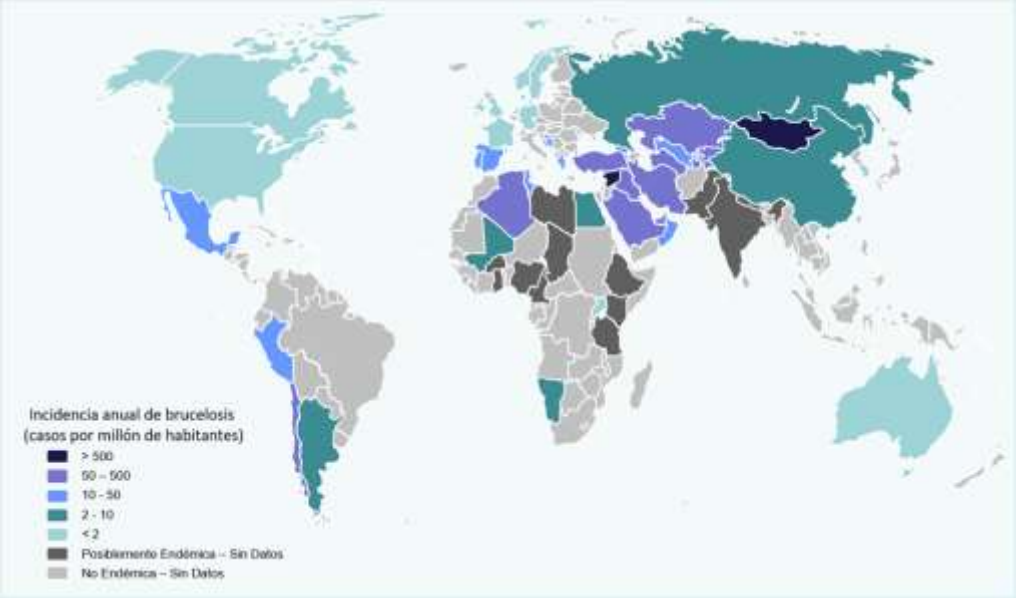


Figura 1: **Mapa global de la incidencia de la brucelosis humana**. Modificación de *Pappas*[15].

Históricamente las regiones con mayor prevalencia correspondían a la región mediterránea de Europa, oeste de Asia y algunas zonas de África y Latinoamérica[15]. En la Argentina, la brucelosis humana se encuentra altamente relacionada con la enfermedad en ganado. Se han reportado casos de infecciones por *B. abortus* (que infecta al ganado bovino), *B. ovis* (ganado ovino), *B. melitensis* (ganado caprino) y, en menor medida, *B. suis* (ganado porcino) y *B. canis* (caninos)[17].

En nuestro país, los casos de brucelosis en humanos deben ser notificados a las autoridades sanitarias. Semanalmente, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de la Dirección de Epidemiologia del Ministerio de Salud de la Nación informa los casos detectados, discriminados por provincia y por regiones sanitarias. El mayor número de casos reportados fue registrado en 1997 con 687 casos, y a partir de ese momento la incidencia comenzó a descender hasta los 300 casos por año en 2005[17]. En la Figura 2 se puede observar que a partir de 2007 el número de casos reportados fue variable, con una tendencia continua hacia el descenso.

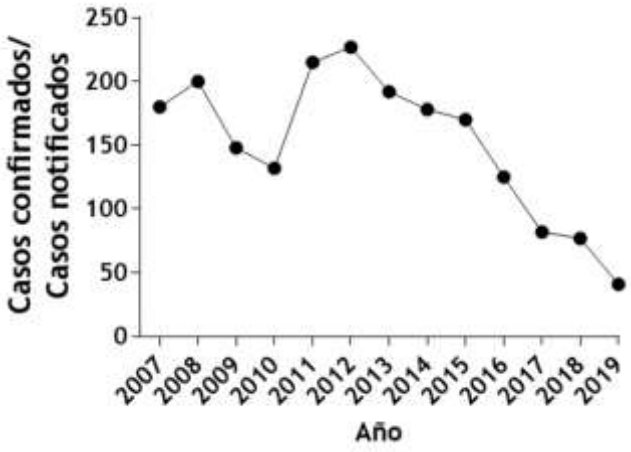


Figura 2: Incidencia de brucelosis humana en Argentina. Fuente: Boletín integrado de Vigilancia. Ministerio de Salud y Desarrollo de la Nación.

Cabe señalar que, si bien los casos deben ser reportados a las autoridades sanitarias, la enfermedad se encuentra subreportada, razón por la cual las estadísticas oficiales no reflejan el número real de personas infectadas. Se estima que la verdadera incidencia de la enfermedad sería entre 10 y 25 veces más alta que la indicada[17].

Fuentes de Infección

Las principales fuentes de infección para los humanos son tejidos biológicos, productos de abortos, leche y, en menor medida, las secreciones genitales de animales infectados.

La vía de ingreso más importante es el contacto directo con aerosoles o productos infectados a través de las mucosas de las vías respiratorias y digestiva, aunque la bacteria también puede ingresar por laceraciones o abrasiones presentes en la piel[1,3]. La tabla 2 presenta las vías de transmisión más comunes junto con la fuente de infección y población de riesgo asociada a esa vía.

VÍA DE TRANSMISIÓN	PUERTA DE ENTRADA	FUENTE DE INFECCIÓN	POBLACIÓN EN RIESGO
Contacto	Piel erosionada, conjuntiva, mucosa nasal	Tejidos animales o personas infectadas o sus productos como ganglios, sangre, orina, semen, secreciones vaginales, fetos abortados y placentas	Trabajadores de la industria de la carne, veterinarios, peones de campo, personal de laboratorio o de servicios de salud
Ingestión	Mucosa digestiva	Alimentos no pasteurizados de origen animal como leche y sus derivados, y en menor medida carnes poco cocidas (la carga bacteriana en el tejido muscular es baja)	Población en general
Inhalación	Mucosa nasal	Aerosoles en laboratorios con muestras contaminadas, vacunas vivas, aerosoles en lugares contaminados como establos, mataderos, salas de recepción de leche, lanas, etc	Personal de laboratorio, trabajadores de la lana, personal de limpieza de los establos
Inoculación	Parenteral o endovenosa por transfusiones	Vacunas vivas, material biológico contaminado	Personal de laboratorio, veterinarios, población en general
Perinatal	Vía transplacentaria o mucosas	Tejidos maternos infectados, leche materna	Fetos

Tabla 2: **Vías de infección de *Brucella* spp. en el hombre y poblaciones susceptibles**[1].

La brucelosis presenta dos patrones epidemiológicos en el hombre: un patrón urbano-alimentario asociado al consumo de leche no pasteurizada y/o quesos contaminados; y un patrón rural-laboral dado por exposición al ganado infectado y/o contacto o inhalación de sus fluidos o productos[1].

La presentación en humanos resulta frecuente en países donde la infección por *Brucella* es endémica en la población animal. Sin embargo, la transmisión de persona a persona es extremadamente inusual[18].

Debido a su potencial epidémico, la ausencia de vacuna para humanos y la eficiencia de infección por aerosoles, *Brucella* es clasificada como un patógeno perteneciente al Nivel de Bioseguridad 3 y considerada un potencial agente bioterrorista[19].

Sintomatología

Tanto el cuadro clínico como la evolución de la infección varía sustancialmente en función de la especie infectada. La principal manifestación clínica de la infección aguda en animales es la aparición de abortos espontáneos durante el último tercio de la gestación o el nacimiento de animales prematuros poco viables[20]. Si bien la enfermedad suele ser asintomática en hembras no preñadas, se ha reportado que entre el 40 y 50% de las hembras enfermas tienen dificultades en la capacidad reproductiva como consecuencia de la infección. Por otro lado, machos bovinos infectados presentan alteraciones testiculares asociadas a una disminución en la fertilidad y la presencia, en ocasiones de abscesos en testículos y/o epidídimo[20].

En relación a la infección en humanos, el periodo de incubación puede oscilar entre 1 y 3 semanas, dependiendo de la virulencia de la cepa infectiva, la vía de ingreso y la dosis infectante. De acuerdo al tiempo de presentación y la evolución de la sintomatología, Young realizó una clasificación arbitraria de la enfermedad bajo 3 estadios: aguda, subaguda y crónica. Los primeros 3 meses se considera la fase aguda de la enfermedad, subaguda cuando el proceso infeccioso lleva entre 3 meses y 1 año de evolución y, por último, crónico cuando continua por más de un año[21].

Resulta interesante notar que la virulencia y la tendencia hacia la forma aguda de la enfermedad varía según la especie de *Brucella* involucrada en la infección. Las especies mayormente asociadas a la presentación crónica de la patología son *B. abortus* y *B. suis* mientras que, por el contrario, *B. melitensis* suele provocar infecciones más agudas y severas tanto en humanos como en ganado[21].

La sintomatología asociada a esta infección es muy diversa entre la población afectada. Dentro de los síntomas más comunes se encuentran la fiebre, cefalea, escalofríos, fatiga, diaforesis, mialgias, artralgia, disuria, pérdida de peso, anorexia y malestar generalizado[1]. Si bien la enfermedad posee una baja tasa de mortalidad, puede llegar a producir secuelas incapacitantes de diversa magnitud.

Una de las características clínicas más relevantes de esta patología es la presentación de manifestaciones focalizadas en diversos órganos[22,23]. El sistema urogenital constituye el segundo sitio más frecuente tanto en hombres como en mujeres. En el caso de las mujeres, la infección durante el embarazo aumenta el riesgo de aborto espontaneo, principalmente durante el primer y segundo trimestre[20,24]. Por otro lado, *Brucella* también tiene la capacidad de infectar el sistema nervioso, dando lugar a la neurobrucelosis, caracterizada por pérdida de sueño, dolores de cabeza, confusión, sordera, encefalitis y meningitis[25].

Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico de la brucelosis es difícil dado el amplio espectro de manifestaciones clínicas que puede presentar. Además de considerar la historia clínica del paciente y su posible contacto con alguna fuente

infectada, es recomendable realizar un estudio bacteriológico complementado con un análisis de anticuerpos séricos específicos. Si esta afección es diagnosticada de manera temprana y se trata de forma adecuada, por lo general presenta una evolución favorable.

Los métodos serológicos solamente aportan diagnósticos presuntivos. El diagnóstico definitivo debe realizarse por aislamiento del microorganismo a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos del paciente. Sin embargo, las dificultades propias de la implementación del aislamiento de *Brucella* hacen que los métodos indirectos de detección sean los más utilizados.

El tratamiento recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la brucelosis aguda en adultos contempla la administración de doxicilina (100 mg) durante 6 semanas combinada con estreptomicina (750 mg) durante 2 a 3 semanas o rifampicina (600 a 900 mg) durante 6 semanas. También se puede utilizar trimetoprima-sulmetoxazol o quinolonas en combinación con los antibióticos anteriores[1]. En pacientes con formas agudas de la enfermedad, la administración precoz y prolongada de estas combinaciones de antibióticos logra la remisión del cuadro clínico en al menos el 90% de los casos.

Se dispone de vacunas contra la brucelosis en animales, que se obtienen a partir de cepas vivas atenuadas. En la actualidad se utilizan dos cepas vacunales lisas: *B. abortus* cepa 19 (S19) para el ganado vacuno y *B. melitensis* REV-1 para pequeños rumiantes; y una cepa rugosa: *B. abortus* RB51 para el ganado vacuno[26]. Hasta el momento no ha sido posible el desarrollo de una vacuna para humanos.

Sistema Inmune

El sistema inmune comprende los mecanismos fisiológicos que permiten el reconocimiento y la eliminación o neutralización de sustancias o microorganismos externos. Este sistema está compuesto por diversos agentes humorales y celulares que pueden ser clasificados en innatos o adaptativos, dependiendo de su mecanismo de activación y de acción.

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa del organismo frente a patógenos invasivos. Dentro de las diferentes poblaciones celulares que conforman el sistema inmune innato podemos encontrar poblaciones celulares con la capacidad de fagocitar a los microorganismos, como son los neutrófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas, y células linfoides innatas como las células *Natural Killer* (NK) y los linfocitos T γδ.

La presencia de agentes infecciosos puede ser reconocida por diferentes mecanismos que incluyen el reconocimiento por parte de un gran repertorio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés). Estos receptores, presentes en diversas células del sistema inmune innato son capaces de reconocer diferentes tipos de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés). Como su nombre lo indica, los PAMPs son estructuras moleculares conservadas por grandes grupos de patógenos y que resultan esenciales para su ciclo de vida[27].

Las células del sistema inmune innato contribuyen al control de las infecciones por su rol como efectoras, y como iniciadoras y/o moduladoras de la respuesta inmune adaptativa, direccionándola hacia un perfil funcional determinado. En particular, los macrófagos y las células dendríticas son los principales

iniciadores de la inmunidad adaptativa, a través de la producción de mediadores proinflamatorios y la expresión de moléculas coestimulatorias (como CD80/86, CD40, etc.)[28]. Más aun, las células dendríticas son las responsables de activar a los linfocitos *naive* en los ganglios linfáticos y promover su diferenciación a los diferentes perfiles funcionales.

Células Endoteliales

La invasión inicial de muchos patógenos se encuentra asociada al ingreso al sistema vascular para su diseminación y/o transmisión. Por este motivo, las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos, además de su evidente función estructural, resultan participantes cruciales y activos en la respuesta inmune desencadenada frente a patógenos.

Las células endoteliales constituyen una barrera física entre los fluidos en circulación y los tejidos[29]. Además de su función estructural y su gran importancia en el mantenimiento de la hemostasia, estas células presentan la capacidad de reconocer la presencia de patógenos y responder ante ellos alertando al sistema inmune[30].

En tejidos no inflamados, las células endoteliales mantienen la fluidez de la sangre, regulan el flujo sanguíneo, controlan la permeabilidad de la pared vascular y mantienen el estado de reposo de los leucocitos circulantes[29].Tanto la circulación como el flujo sanguíneo se encuentra finamente regulado por un balance de señales protrombóticas y antitrombóticas, el cual aumenta o disminuye el tono de la musculatura lisa circundante al vaso sanguíneo[29].

En condiciones fisiológicas, las células endoteliales en reposo no interaccionan con los leucocitos en circulación[31]. Esta falta de interacción se debe al secuestro de las proteínas especificas involucradas dentro de vesículas secretorias especializadas conocidas como Cuerpos de Weibel-Palade, en el citoplasma de la célula endotelial[32,33]. Más aun, las células endoteliales en reposo poseen suprimido el mecanismo de transcripción de otras moléculas de adhesión involucradas, como es el caso de E-selectina (CD62E), VCAM-1 (CD106) e ICAM-1 (CD54). Por último, la producción basal de óxido nítrico (NO) también contribuye a la quiescencia del endotelio en reposo mediante diversos mecanismos que incluyen la inhibición de la expresión de genes proinflamatorios[34]. La incapacidad del endotelio para regular estas funciones basales de manera adecuada es denominada “disfunción endotelial”.

Frente al reconocimiento de un estímulo inflamatorio, ya sea una lesión tisular, el ingreso de un patógeno o la presencia de citoquinas proinflamatorias, el endotelio adquiere un fenotipo activado. La activación endotelial permite la aparición de los tres componentes clásicos que subyacen a los puntos cardinales de la inflamación. En primer lugar, un aumento en la circulación local, responsable de la coloración rojiza (rubor) y el aumento de temperatura local (calor). Concomitantemente, el exudado de plasma rico en proteínas hacia los tejidos es responsable de la hinchazón o tumefacción (tumor). Por otro lado, ocurre el reclutamiento localizado de leucocitos circulantes que, a su vez, liberan mediadores proinflamatorios que estimulan los nervios circundantes, provocando dolor[35].

Una vez gatillada la activación de la célula endotelial, ocurre la exocitosis de los Cuerpos de Weibel-Palade, exponiendo las moléculas de P-selectina necesarias para el inicio de la extravasación leucocitaria[36]. Este proceso comprende una serie de procesos encadenados dentro del lumen vascular que culmina con la localización intratisular de los leucocitos. En la primera etapa, conocida como *tethering*, ocurre la marginación de los leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia la pared de los vasos e inician las primeras interacciones con el endotelio. Luego, durante la etapa de *rolling*, las células "ruedan" a lo largo del endotelio gracias al establecimiento de uniones inestables en las que intervienen selectinas y sialomucinas. A continuación, ocurre la adhesión estable al endotelio, mediada por integrinas, que da lugar a la diapédesis o transmigración y, finalmente, la migración por la matriz extracelular[37] (Figura 3).

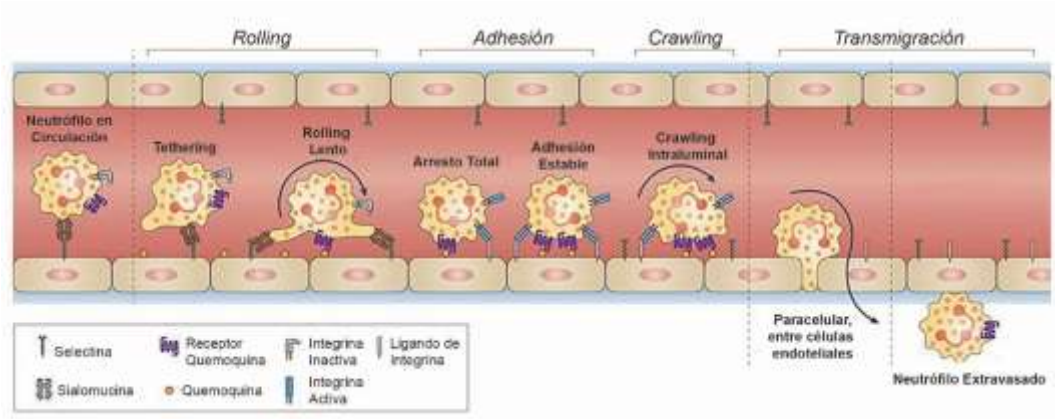


Figura 3: **Etapas de la extravasación leucocitaria**. Adaptación de *Kolaczkowska & Kubes*[38].

Los leucocitos pueden atravesar el endotelio por dos vías diferentes. La ruta de transmigración más frecuente, denominada *paracelular*, es a través de las uniones entre células endoteliales. La vía alternativa o *transcelular* consiste en atravesar el cuerpo de la célula endotelial[39].

Las características que presenta el endotelio en los distintos tipos de vasculatura difieren en cuanto a su continuidad y permeabilidad[40]. En particular, las células endoteliales presentes en la barrera hematoencefálica presentan características únicas en cuanto a la presencia de gran cantidad de uniones intracelulares, la ausencia de fenestraciones y el bajo nivel de actividad pinocítica, entre otras. Estas características confieren una mayor protección al sistema nervioso central, impidiendo la entrada de patógenos y toxinas[41]. Más aun, dado el limitado acceso de anticuerpos y células inmunes a través de la barrera hematoencefálica, el sistema nervioso central es considerado un sistema inmunológicamente privilegiado[42].

Monocitos y Macrófagos

Los monocitos y macrófagos son células pertenecientes al linaje mieloide que juegan un papel fundamental en la homeostasis de tejidos y en la inmunidad. Luego de su diferenciación en médula ósea, los monocitos ingresan de forma continua a la circulación periférica, donde constituyen alrededor del 10% de la población leucocitaria[43].

En circulación periférica se pueden encontrar tres subpoblaciones de monocitos, caracterizadas por su expresión diferencial de los marcadores de superficie CD14 y CD16[44]. Los denominados "monocitos clásicos" expresan altos niveles de CD14 y nulos de CD16 en superficie, constituyendo aproximadamente el 90% de la población. A su vez, los monocitos que expresan CD16 pueden subdividirse en dos poblaciones diferentes, los "monocitos intermedios" que expresan valores relativamente altos de CD14 e intermedios de CD16 y los "monocitos no-clásicos" con baja y alta expresión de CD14 y CD16, respectivamente[45].

Su llegada a tejidos periféricos ocurre a través de vénulas post-capilares. Una vez que los monocitos extravasan a los tejidos, ocurre un proceso de maduración y diferenciación hacia macrófagos o hacia células dendríticas. Dependiendo de la localización anatómica en la cual se encuentren, los macrófagos reciben nombres específicos como es el caso de las células de *Kupffer* en el hígado, de la microglía en el sistema nervioso central y macrófagos alveolares en el pulmón. Si bien las subpoblaciones de monocitos presentan diferencias funcionales, comparten su capacidad de actuar como reservorio de precursores celulares para la renovación de las poblaciones de macrófagos y células dendríticas en los tejidos[46,47].

En las primeras etapas de la inflamación, los monocitos clásicos son reclutados al sitio de infección donde median una respuesta inmune muy potente mediante la producción de citoquinas y la fagocitosis de matriz extracelular, microorganismos y células muertas[48]. Unos días después, cuando se resuelve la inflamación aguda, la presencia de monocitos clásicos disminuye y son secuencialmente reemplazados por monocitos intermedios y no-clásicos[49]. Mientras los monocitos/macrófagos clásicos están principalmente asociados a la respuesta inmune *per se*, los monocitos/macrófagos intermedios se encuentran asociados a la cicatrización de los tejidos y la revascularización de la zona lesionada[33]. Por último, los monocitos/macrófagos no-clásicos presentan un comportamiento de patrullaje y vigilancia constante del endotelio[51] y, en condiciones patológicas, están asociados a la aparición de fibrosis tisular[52].

Células Polimorfonucleares

Las células polimorfonucleares (PMN), o granulocitos, son células pertenecientes al linaje mieloide que comparten como características citológicas la presencia de un núcleo multilobulado y gran cantidad de gránulos intracitoplasmáticos. Dentro de esta población se encuentran comprendidos los neutrófilos, eosinófilos y los basófilos, identificados principalmente por la apariencia, composición y funcionalidad de los gránulos que contienen. Dentro de esta categoría, los neutrófilos son los PMN más abundantes en circulación periférica[53]. Luego de su diferenciación en médula ósea, los neutrófilos permanecen en circulación hasta que son reclutados a los sitios de infección y/o inflamación.

Los PMN también son células fagocíticas profesionales. Una vez reconocido el patógeno, ocurre la invaginación de la membrana celular dando lugar a la formación de un fagosoma que contiene el microorganismo y la activación de los mecanismos microbicidas[54]. Los mecanismos microbicidas del neutrófilo pueden clasificarse en dependientes del oxígeno, asociados a la activación de la *nicotinamida adenina dinucleotido fosfostafo* (NADPH) oxidasa y la consecuente producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), o independientes del oxígeno que involucran la secreción de proteínas con acción antimicrobiana[55].

Además de la fagocitosis, los neutrófilos pueden mediar la muerte extracelular de los microorganismos a través de la liberación de trampas extracelulares (NETs, por sus siglas en ingles). Estas NETs se generan como consecuencia de la liberación de cromatina descondensada y proteínas nucleares, citoplasmáticas y granulares al medio extracelular. La principal función de las NETs sería la contención de bacterias tanto Gram positivas como negativas, evitando su diseminación y favoreciendo su eliminación de manera extracelular[56,57].

Plaquetas

Las plaquetas son pequeños elementos celulares anucleados derivados de los megacariocitos. Estas pequeñas células circulan por los vasos sanguíneos desempeñando un papel fundamental en la hemostasia y la trombosis[58,59].

Además de las diversas organelas presentes en el citoplasma, las plaquetas contienen tres tipos de organelas secretorias: los gránulos α, los gránulos densos (δ) y los lisosomas. Ocasionalmente también pueden presentar cuerpos multivesiculares.

Los gránulos más abundantes son los del tipo α, con una estructura subdividida en cuatro regiones con diferente composición. Dentro de las diversas sustancias almacenadas en este tipo de gránulos se encuentran principalmente quemoquinas y proteoglicano, fibrinógeno, y el factor de Von Willebrand[60]. Los gránulos densos son más pequeños y morfológicamente más variables que los gránulos α[61]. Tienen una estructura característica y contienen polifosfatos, nucleótidos de adenina (ATP y ADP), aminas biológicamente activas (serotonina e histamina) y elevadas concentraciones de calcio y magnesio. Finalmente, los lisosomas contienen diferentes tipos de hidrolasas ácidas junto con Catepsina D y E, WAMP-1, LAMP-2 y CD63.

En condiciones normales, existe un equilibrio entre los mecanismos pro- y anti-trombóticos que evita que las plaquetas en circulación se adhieran a la superficie endotelial o entre ellas. La lesión de un vaso sanguíneo desencadena un proceso llamado hemostasia, un proceso dinámico y altamente regulado por el cual se restaura la integridad del sistema circulatorio luego de sufrir un daño vascular.

La activación plaquetaria y la formación del trombo son elementos claves para la hemostasia normal. Sin embargo, la activación en lugares inapropiados puede derivar en diversas patologías y, en ocasiones, suele ser una de las principales causas de infartos de miocardio y/o accidentes cerebro vasculares[62].

La activación plaquetaria desencadenada por cualquier estímulo implica diversos cambios a nivel morfológico y fisiológico. En primer lugar, la unión al colágeno y vWF presentes en la matriz extracelular favorecen la adhesión al endotelio[63]. En segundo lugar, ocurre el ensamblaje de integrinas en la superficie celular que actúan como mediadoras de la adhesión y agregación plaquetaria, permitiendo la formación de puentes entre plaquetas gracias a su capacidad de unión a vWF o fibrinógeno[63–67]. En paralelo, la activación plaquetaria desencadena la liberación del contenido de los gránulos contenidos en el citoplasma de las plaquetas. La interacción de los diferentes mediadores solubles liberados con sus respectivos receptores da lugar al mecanismo de *feedback* positivo que favorece la aparición del coágulo inicial y que detiene la pérdida de sangre causada por el daño en el vaso sanguíneo.

Rol de las Plaquetas en el contexto infeccioso

Interacción entre Plaquetas y Patógenos

Además de las integrinas y receptores involucrados en la respuesta hemostática, las plaquetas expresan un amplio espectro de receptores capaces de reconocer moléculas patogénicas y mediadores inmunes, similar al expresado por fagocitos profesionales[68]. Dentro de este grupo de receptores se encuentran los receptores de complemento, el receptor de la región constante de la inmunoglobulina G (FcγRII) y receptores de tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés)[69,70].

El reconocimiento de diversas bacterias por estos receptores es capaz de inducir la agregación[71] y consecuente activación de las plaquetas, gatillando la secreción de los productos contenidos en los distintos tipos de gránulos. Estos factores pueden tener actividad microbicida directa (como en el caso de las β-defensinas, trombocidinas y quinocidinas)[72–74], o indirecta, regulando la respuesta inmune del hospedador (como en el caso de las citoquinas pro-inflamatorias y quemoquinas inmunomodulatorias)[75,76]. Estudios recientes demostraron la capacidad de las plaquetas activadas para internalizar algunas especies bacterianas[77–79]. Estos trabajos sugieren que la internalización de las bacterias por parte de las plaquetas podría funcionar como un mecanismo de evasión al sistema inmune o, por el contrario, favorecer la lisis bacteriana dentro del citoplasma de las plaquetas.

Numerosos estudios demuestran que las plaquetas juegan un papel importante en la protección contra la infección por algunos patógenos como es el caso de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y sugieren que las mismas podrían ser un factor clave en la defensa frente a otras infecciones bacterianas.

Modulación de la respuesta inmune del hospedador frente a la infección

Las plaquetas han sido ampliamente descriptas como mediadoras de la hemostasia y encargadas de mantener la integridad vascular[58]. Sin embargo, estudios recientes demuestran que también cumplen un papel muy importante en la modulación de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa[58,80,81]. La función inmunomoduladora deriva de su capacidad de interactuar con diversas clases de leucocitos, incluyendo monocitos[82], neutrófilos[83] y linfocitos[84], así como de su capacidad de liberar una gran variedad de citoquinas y quemoquinas.

Como se mencionó anteriormente, una de las consecuencias de la activación plaquetaria es la degranulación, en la cual la fusión de los gránulos α con la membrana plasmática libera una gran cantidad de proteínas que tienen diversas funciones a nivel local y/o sistémico. Entre ellas se encuentran factores de coagulación, mitógenos, factores angiogénicos y mediadores inflamatorios. Además, dentro del contenido de los gránulos α se pueden encontrar quemoquinas de la familia CXC como β-tromboglobulina, Factor Plaquetario 4 (PF4 o CXCL4), ENA-78 (CXCL5) y GROα (CXCL1); quemoquinas de la familia CC como RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2) y MIP-1α (CCL3); y moduladores como CD40-Ligando, TREM-1-Ligando y TGF-

β1. Estas quemoquinas liberadas juegan un papel central en la inflamación por su habilidad para reclutar y activar leucocitos.

Por otro lado, la degranulación expone proteínas específicas en la membrana plasmática como es el caso de la P-selectina. El ligando de P-selectina 1 (PSGL-1, por sus siglas en inglés) es una mucina homodimérica que se expresa en la superficie de neutrófilos, monocitos, células dendríticas y algunas subclases de linfocitos. Las plaquetas también presentan PSGL-1 en su superficie, la cual interactúa con la P-selectina en células endoteliales[85]. El par P-selectina/PSGL-1 constituye el principal mediador de las interacciones físicas entre las plaquetas y los leucocitos en la formación de agregados mixtos y su unión permite el reclutamiento eficiente de los leucocitos hacia la región de lesión vascular[86,87]. Esta unión ligando-receptor desencadena una cascada de señales intracelulares que promueve la activación de Mac-1 (CD11b/CD18 o αMβ2) y LFA-1 (CD11a/CD18 o αLβ2) en la membrana de neutrófilos[88–90]y de las integrinas β1 y β2 en superficie de monocitos[91] y linfocitos[92,93], entre otras.

Como se mencionó anteriormente, algunas de las consecuencias funcionales de la interacción directa plaqueta-leucocito o de la liberación de mediadores solubles en el microambiente de la interacción son la inducción de un fenotipo inflamatorio en los leucocitos por cambios en la expresión génica[94–97], cambios en el metabolismo celular del Ácido Araquidónico[98,99], inducción de especies reactivas del Oxígeno en neutrófilos[100,101] y monocitos[102], estimulación de la producción de NETs y la inducción de *switch* de clase de inmunoglobulinas asociado a la inducción de la respuesta inmune adaptativa[103].

Respuesta Inmune contra *B. abortus*

Respuesta Inmune Innata

Durante los estadios tempranos de la infección por *Brucella*, el rol principal de la respuesta innata es prevenir la replicación y reducir el número inicial de bacterias, promoviendo el ambiente necesario para una respuesta adaptativa robusta.

Una vez dentro del hospedador, *Brucella* presenta una fase de diseminación extracelular hasta llegar a los macrófagos, su nicho intracelular preferencial. Una vez fagocitada, la bacteria puede ser transportada de manera intracelular hasta los sinusoides del hígado, el bazo, la médula ósea y los órganos linfáticos, donde es capaz de permanecer y replicarse dentro de los macrófagos[1,104]. Por otro lado, los macrófagos activados son los principales responsables de la eliminación de estas bacterias en los estadios tardíos de la infección, una vez iniciada la respuesta adaptativa. De esta manera, los macrófagos parecerían cumplir un rol dual durante la infección, ya que permiten la replicación y supervivencia de la bacteria durante las etapas tempranas mientras que son los encargados de su eliminación en etapas posteriores[13,105]. La habilidad de *Brucella* para persistir dentro de los macrófagos infectados determina la progresión de la patología, la cual incluye su tendencia a presentar recidivas y su evolución hacia formas crónicas de la enfermedad[1,2,104].

Con respecto a los neutrófilos, su rol en la infección mediada por *B. abortus* aún resulta controversial. Si bien algunos estudios realizados en diferentes modelos de ratones neutropénicos sugieren que las células polimorfonucleares no juegan un papel significativo en las primeras etapas de la infección[106–108], Gutierrez-

Gimenez y colaboradores revelaron que los neutrófilos podrían propagar la infección a través de un mecanismo conocido como "caballo de Troya", transportando la bacteria hacia monocitos, nódulos linfáticos y el sistema retículo-endotelial[109–112]. Por el contrario, otros trabajos han demostrado que la depleción de neutrófilos permitiría una eficiente eliminación de *B. abortus* en estadios tardíos de la infección, sugiriendo un posible efecto inhibitorio de los neutrófilos sobre la respuesta inmune adaptativa[108]. La controversia continúa cuando analizamos trabajos realizados *in vitro*. A pesar de ser internalizada por células polimorfonucleares[113,114], *B. abortus* es capaz de inhibir el estallido respiratorio y las acciones microbicidas, sobreviviendo dentro de las células infectadas por periodos extensos[106,111,115]. Por otra parte, en nuestro laboratorio demostramos previamente que *B. abortus* muerta por calor, así como sus lipoproteínas, son capaces de inducir la activación de neutrófilos[116]. Más aun, esta activación de neutrófilos estaría asociado a la patogenicidad de *Brucella* ya que contribuiría al daño tisular e inflamación localizada características de la enfermedad[116].

Por su parte, las células dendríticas también pueden ser infectadas por *Brucella*[117–119]. Más aun, se ha comprobado que las lipoproteínas de la membrana externa de *B. abortus* pueden inducir la maduración de estas células, orientando el desarrollo de una respuesta del tipo Th1[120].

En cuanto a las células NK, se demostró que la presencia de macrófagos infectados con *B. suis* en cultivos de células NK es suficiente para activar la producción de IFN-γ y TNF-α y la destrucción de los macrófagos[121]. Las células NK son importantes para la activación de células B y la consecuente producción de anticuerpos[122]. Sin embargo, fue descripta una disminuida actividad citotóxica de células NK en pacientes con brucelosis aguda[123]. Más aun, estas células no tendrían un rol crucial en el control de la brucelosis humana, ni murina ya que su depleción *in vivo* no afecta el curso de la infección en ratones[124].

Respuesta Inmune Adaptativa

A pesar de la activación de todos los componentes y mecanismos de la inmunidad innata frente a una infección con *B. abortus*, éstos no siempre son suficientes para su erradicación. Por lo tanto, el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa que combata la infección es absolutamente necesaria[125].

Se han identificado tres mecanismos esenciales de la respuesta inmune adaptativa para el control de la infección por *Brucella*: en primer lugar, la producción de IFN-γ por los linfocitos T $CD4^+$, $CD8^+$ y γδ, el cual activa las funciones bactericidas del macrófago inhibiendo la supervivencia intracelular de las bacterias[126,127]. En segundo lugar, la citotoxicidad de los linfocitos T $CD8^+$ y γδ sobre los macrófagos infectados[128–130]. Por último, la presencia de anticuerpos característicos en una respuesta de tipo Th1, como IgG2a e IgG3, que opsonizan al patógeno facilitando su fagocitosis[131,132].

Los antígenos de *B. abortus* pueden ser presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tanto de clase I como de clase II y, por lo tanto, pueden estimular la activación de células T $CD8^+$ y $CD4^+$, respectivamente[128,133]. Si bien la mayoría de los estudios señala a los linfocitos T $CD4^+$ como los principales productores de IFN-γ[134–136], los linfocitos T $CD8^+$, γδ y las células NK también pueden hacerlo [137].

La infección con *B. abortus* induce una poderosa respuesta inmune de tipo Th1[125,138]. Diversos estudios demuestran la importancia de las células Th1 en la respuesta frente a *Brucella*. En primer lugar, se demostró que ratones deficientes en elementos claves de la respuesta Th1 resultan más susceptibles a la infección. A su vez, la administración exógena de dichas citoquinas es capaz de rescatar esta deficiencia, favoreciendo el desarrollo de una respuesta protectora[136,139]. Por otro lado, estudios realizados en pacientes con brucelosis señalan una correlación entre respuesta Th1 disminuida y una mayor tasa de recaídas o establecimiento de estadios crónicos de la enfermedad, resaltando la importancia del desarrollo de una repuesta de tipo Th1 para combatir la infección[140–142].

Por su parte, la principal función de los linfocitos T $CD8^+$ es eliminar las células infectadas, ya sea mediante la interacción Fas-FasL o por la secreción de perforinas y granzimas[128,129]. Recientemente ha sido descripto el potencial citotóxico de los linfocitos T $CD4^+$ frente a la presencia de *B. abortus* en ratones.

Por el momento, la contribución humoral a la respuesta inmune frente a *Brucella* no ha sido completamente esclarecida. Ha sido demostrado la aparición de anticuerpos específicos dirigidos contra diversos componentes del microorganismo en los estadios tempranos de la infección. Estos anticuerpos están especialmente dirigidos contra antígenos superficiales como el LPS[143], y pueden permanecer detectables en el suero durante años. Si bien la opsonización de las bacterias por anticuerpos favorece su fagocitosis, disminuyendo la carga bacteriana inicial, la naturaleza intracelular de *Brucella* limita este efecto y permite que la enfermedad progrese[144].

Una de las citoquinas con mayor relevancia durante la infección con *Brucella* es el IFN-γ. Algunas de sus funciones clave en la inmunidad son la activación de las funciones bactericidas del macrófago, la inducción de la expresión de moléculas de MHC y co-estimulatorias en las células presentadoras de antígenos profesionales, la estimulación de la citotoxicidad de las células T citotóxicas y la potenciación de la muerte de los macrófagos infectados[138]. La importancia del IFN-γ en la resolución de la infección por *Brucella* fue demostrada en estudios realizados con ratones deficientes para este gen, los cuales mueren dentro de las 6 semanas post-infección con *B. abortus*[127]. A pesar de que *Brucella* resulta ser un fuerte inductor de IFN-γ, algunos estudios sugieren que la activación de los macrófagos por IFN-γ impide el establecimiento del nicho replicativo. De esta manera, el efecto protector de esta citoquina se perdería una vez que las bacterias ya se encuentran localizadas intracelularmente [145].

Hipótesis y Objetivos

Durante los estadios tempranos de la infección por *Brucella*, el rol principal de la respuesta inmune innata es prevenir la replicación y reducir el número inicial de bacterias, promoviendo el ambiente necesario para una respuesta adaptativa robusta. Las plaquetas, junto con los neutrófilos y los monocitos, son una de las primeras células con las que se encuentran las bacterias al ingresar al organismo.

Las plaquetas han sido ampliamente descriptas como mediadoras de la hemostasia y encargadas de mantener la integridad vascular[58]. Sin embargo, en los últimos años ha crecido la bibliografía demostrando su relevancia en la modulación de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa[58,80,81].

A pesar de los avances en el estudio de la interacción de las plaquetas con diversos agentes infecciosos y de la importante participación que se les ha atribuido en la modulación de la respuesta inmune, **la interacción entre las plaquetas y las bacterias del género *Brucella* no había sido explorada**.

Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que la presencia de plaquetas favorece la invasión temprana de monocitos/macrófagos por parte de *B. abortus* y que las mismas forman complejos mixtos con los monocitos infectados. Más aun, las plaquetas promueven la secreción de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas, y la expresión de moléculas de adhesión y coestimulatorias por parte de los monocitos/macrófagos infectados potenciando la función de dichas células.

Por este motivo, el **objetivo general** de este proyecto fue **dilucidar el rol de las plaquetas en la respuesta inmune frente a la infección por *Brucella* y en la patogénesis de la brucelosis**.

Nuestra **hipótesis de trabajo** consiste en que **el reconocimiento de *B. abortus* es capaz de desencadenar la activación plaquetaria, promoviendo la respuesta del sistema inmune innato. De esta manera, la inducción de perfiles proinflamatorios contribuiría a la resolución de la infección, denotando un rol protector de las plaquetas frente a la infección por *Brucella*.**

Para poner a prueba nuestra hipótesis, formulamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. **Determinar el rol de las plaquetas en el curso de la infección por *B. abortus* de monocitos/macrófagos humanos**. Se estudiará el mecanismo por el cual las plaquetas favorecen la invasión de monocitos/macrófagos por parte de *B. abortus*. Además, se estudiarán los posibles factores solubles involucrados en la inducción del perfil proinflamatorio de los monocitos/macrófagos y las consecuencias funcionales de dicha modulación.
2. **Determinar el rol de las plaquetas en la respuesta inmune mediada por neutrófilos humanos frente a la infección por *B. abortus***. Se estudiará la interacción entre plaquetas y neutrófilos, así como la capacidad de las plaquetas para modular aspectos funcionales de los mismos.
3. **Estudiar el rol de las plaquetas en la modulación de la capacidad migratoria de monocitos/macrófagos y neutrófilos humanos durante el curso de la infección por *B. abortus***. Se estudiará la capacidad de las plaquetas para modular la activación endotelial, y algunos pasos claves en el proceso de migración y extravasación de monocitos y neutrófilos en el contexto de la infección.

Materiales y Métodos

Aspectos Éticos

Las plaquetas, monocitos y neutrófilos utilizados durante los experimentos de esta tesis fueron obtenidos a partir de sangre de dadores sanos o pacientes con brucelosis. Siguiendo los lineamientos del comité de ética del Instituto de Medicina Experimental (IMEX – CONICET – ANM), todos los voluntarios otorgaron su consentimiento informado antes de la donación.

Bacterias

B. abortus de las cepas S2308 y S2308-GFP fueron crecidas en placas de Tripteína-Soja Agar, suplementada con extracto de levadura (*Merck Millipore*). La cantidad de bacterias presente en los cultivos en fase estacionaria fue determinada por comparación de la densidad óptica a 600 nm con una curva estándar.

Todas las tareas de manipulación de las cepas vivas fueron realizadas en laboratorios de bioseguridad de nivel 3, ya sea del INBIRS (Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA) o del ANLIS-Malbrán (Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Dr. Carlos G. Malbrán).

Líneas celulares

Monocitos Humanos (THP-1)

Las células de la línea monocítica humana THP-1 fueron obtenidas de ATCC (*American Type Culture Collection*) y cultivadas en medio estándar compuesto por RPMI 1640 suplementado con *Buffer* Hepes (25 mM), L-glutamina (2 mM), suero fetal bovino inactivado por calor (SFB) (10% final) (*Natocor*), Penicilina (100 U/ml) y Estreptomicina (100 μg/ml). Para inducir la maduración, las células fueron estimuladas con 1α,25-dihidroxivitamina D_3 (0,05 μM) (*Calbiochem Merck Millipore*) por 72 h. La viabilidad celular se midió con el test de exclusión de Azul de Tripán y fue mayor al 95% en todos los experimentos. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2.

Endotelio Humano (HMEC)

Las células de la línea HMEC fueron amablemente cedidas por el laboratorio del Dr. Pablo Baldi de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Las células HMEC fueron cultivadas en medio estándar compuesto por MCDB 131 suplementado con L-glutamina (2 mM), SFB (10% final) (*Natocor*), Factor de Crecimiento Epidermal (10 ng/ml), Hidrocortisona (1 μg/ml), Penicilina (100 U/ml) y Estreptomicina (100 μg/ml).

Endotelio de microvasculatura cerebral humano (HBMEC)

Células endoteliales de la microvasculatura cerebral inmortalizadas (HBMEC) fueron amablemente cedidas por el laboratorio del Dr. Kwang S. Kim de la División de Enfermedades Infecciosas Pediátricas del hospital Johns Hopkins en Baltimore, EEUU. Las células HBMEC fueron cultivadas en medio estándar compuesto por RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (2 mM), Piruvato de sodio (1 mM), SFB (10% final) (*Natocor*), NuSerum IV (10% final) (*Becton Dickinson*), Aminoácidos no esenciales (1% final) (*Life*

Technologies), Vitaminas MEM (1% final) (*Life Technologies*), Penicilina (100 U/ml) y Estreptomicina (100 µg/ml).

Cultivo Primario de Células

Células endoteliales fueron obtenidas a partir de la vena de cordones umbilicales (HUVEC) por digestión enzimática con colagenasa[146]. Una vez establecidos, los cultivos primarios fueron mantenidos en frascos de cultivo con gelatina (2% m/v) y mantenidos en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (2 mM), Piruvato de sodio (1 mM), SFB (10% final) (*Natocor*), Heparina (90 µg/ml), Suplemento de Crecimiento para células endoteliales (50 µg/ml) (*Roche*), Penicilina (100 U/ml) y Estreptomicina (100 µg/ml).

Muestras de Sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas de dadores sanos o pacientes con brucelosis crónica que accedieron voluntariamente a participar de nuestro estudio. Los pacientes fueron diagnosticados por presentaciones clínicas y anamnesis compatibles con brucelosis y presentaron resultados positivos para la prueba de Rosa de Bengala, fijación de complemento (FC) y altos títulos de anticuerpos específicos para *Brucella* cuantificados por una prueba de aglutinación (BPA). De acuerdo con lo descripto en la bibliografía, consideramos que los pacientes se encuentran en la fase crónica de la patología cuando pasaron 12 meses desde la fecha de infección y/o diagnóstico [21,147]. Todos los dadores declararon no haber tomado ninguna medicación en los 10 días previos a la toma de la muestra. La sangre fue recolectada directamente en tubos con citrato de sodio (*Merck Millipore*).

Obtención de Plaquetas

La sangre entera anticoagulada con Citrato (*Merck Millipore*) se centrifugó durante 15 minutos a 200 xg, sin freno y a temperatura ambiente. Para lavar las plaquetas, el plasma rico en plaquetas (PRP) se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó durante 10 minutos a 890 xg, sin freno y a temperatura ambiente en presencia de Prostaglandina I_2 (75 nM) (PGI_2) (*Cayman Chemical*). Finalmente se descartó el plasma y las plaquetas lavadas se resuspendieron en RPMI 1640 sin suero ajustando su concentración a 500.000 plaquetas/µl.

Obtención de Monocitos

Células mononucleares (PBMC) fueron obtenidas mediante centrifugación diferencial. Para ello, sangre entera fue sembrada sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (*GE Healthcare*) y centrifugada por 30 minutos a 350 xg sin freno. Luego, las células mononucleares fueron extraídas del gradiente y lavadas. Los PBMCs fueron resuspendidos en RPMI 1640 suplementado con 10% SFB y sembradas en un gradiente de Percoll (*GE Healthcare*) para su posterior centrifugación durante 40 minutos a 400 xg sin freno. El halo de monocitos se transfirió a un tubo nuevo donde fueron lavados y resuspendidos en RPMI 1640 suplementado con 10% SFB. Solamente se utilizaron muestras en las cuales la pureza de los monocitos $CD14^+$ fuera mayor al 80%, analizada mediante citometría de flujo. En todos los casos, la viabilidad fue mayor al 95%, medida por el test de exclusión de Azul de Tripán.

Obtención de Células Polimorfonucleares

Células polimorfonucleares (PMN) fueron obtenidas mediante centrifugación diferencial. Para ello, sangre entera fue sembrada sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (*GE Healthcare*) y centrifugada por 30 minutos a 350 xg sin freno, tal como fue descripto anteriormente. Luego, se realizó la sedimentación mediante adición de Dextrán y la lisis de eritrocitos mediante un shock hipotónico. Finalmente, los PMN fueron lavados y resuspendidos en RPMI 1640 suplementado con 2% SFB. Solamente se utilizaron muestras en las cuales la pureza de los PMN fuera mayor al 96%, analizada mediante tinción con May Grünwald/Giemsa, y viabilidad mayor al 95%, medida por el test de exclusión de Azul de Tripán.

Reactivos Utilizados

El PF4 recombinante fue comprado a *PeproTech*, mientras que el anticuerpo neutralizante anti-PF4 proviene de *Abcam*. Tanto el CD40L recombinante como el anticuerpo neutralizante de CD40L fueron obtenidos de *BioLegend*. El ácido acetilsalicílico (Aspirina) fue provisto por Sigma-Aldrich. El inhibidor específico de la vía de Erk 1/2 (PD98059) es de *Calbiochem*.

Infecciones *in vitro*

Todas las infecciones de células fueron realizadas por 30 min, 2 o 4 h, en presencia o ausencia de plaquetas (relación Cel: *Ba*: PLT 1:100:100), según lo indicado en cada figura. En todos los casos, la infección se realizó en el medio estándar indicado para el tipo celular en ausencia de antibiótico. Luego, las células fueron lavadas para eliminar la bacteria no internalizada y mantenidas en cultivo con medio suplementado con Gentamicina (100 µg/ml) y Estreptomicina (50 µg/ml). A diferentes tiempos post infección, los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados, filtrados y almacenados a -70°C para posteriores cuantificaciones por ELISA. En otros sets de experimentos, las células fueron igualmente infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas y la expresión de diversos marcadores de superficie fue evaluada por citometría de flujo.

Preparación de Sobrenadantes para Estimulación de Cultivos Celulares

Plaquetas lavadas fueron incubadas con *B. abortus* (PLT: *Ba* 1:1) durante 24 h a 37°C. Luego, los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados, esterilizados por filtrado, ultracentrifugados y almacenados a -70°C hasta su utilización. Como control, se recolectaron sobrenadantes de plaquetas sin infectar y de bacterias solas mantenidas en las mismas condiciones de cultivo.

Ensayos de Microscopía Confocal

Interacción entre plaquetas y B. abortus

Plaquetas lavadas fueron incubadas con *B. abortus*-GFP (PLT: *Ba* 1:1, 1:10 o 1:30) en *chamber-slides* pretratadas con Poli L-lisina (7,5 ng/ml) por 2 h. Luego, las plaquetas fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 2% y marcadas con un anticuerpo monoclonal primario anti-CD61 humano (clon VI-PL2; *BD*

Biosciences) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG1 de ratón conjugado a Alexa 546 (*Molecular Probes Life Technologies*).

Interacción entre monocitos, B. abortus y plaquetas

Células THP-1 fueron incubadas en *chamber-slides* con 10 ng/ml de PMA por 24 h para promover su adhesión. Luego, las células fueron tratadas tal como se especifica en cada figura, fijadas con PFA 2% y permeabilizadas con *buffer* saponina 0,1%. Las muestras fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal primario anti-CD61 humano (clon VI-PL2; *BD Biosciences*) como marcador de plaquetas, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 546 (*Molecular Probes Life Technologies*). Los monocitos fueron marcados con un anticuerpo monoclonal anti-HLA-ABC (W6/32) seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 633 (*Molecular Probes Life Technologies).*

Interacción entre PMN, B. abortus y plaquetas

Neutrófilos aislados fueron sembrados sobre cubreobjetos pretratados con Poli L-lisina (7,5 ng/ml). Luego, los PMN fueron infectados con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas por 1 h. Las células fueron lavadas, fijadas con PFA 2% y marcadas con un anticuerpo monoclonal primario anti-CD61 humano (clon VI-PL2; *BD Biosciences*), como marcador de plaquetas, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (*Molecular Probes Life Technologies*). Los PMN fueron marcados utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD11b (*BD Biosciences*) seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 546 (*Molecular Probes Life Technologies).*

En todos los casos, los portaobjetos fueron montados con PolyMount (*Polysciences*) y analizados utilizando un microscopio confocal FV-1000 con un objetivo de inmersión en aceite de Plano Apocromático 60X NA1.42 (*Olympus*). Las imágenes fueron procesadas con el software FIJI (*open source*).

Recuento de Unidades Formadoras de Colonias

Recuento intracelular en plaquetas

Plaquetas lavadas fueron infectadas con *B. abortus* a diferentes concentraciones (PLT: *Ba* 1:1, 1:10 y 1:30) por 2 h en medio sin antibiótico. Luego fueron tratadas con Gentamicina (100 µg/ml) y Estreptomicina (50 µg/ml) por 30 min para eliminar toda la bacteria no internalizada. Finalmente, las plaquetas fueron lisadas con una solución de Tritón X-100 (0,01% v/v) y el lisado fue plaqueado en Tripteína-Soja Agar suplementado con extracto de levadura. Pasados 4 días se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Recuento intracelular en monocitos

Células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* en ausencia o presencia de plaquetas a diferentes concentraciones (THP-1: *Ba*: PLT 1:100:1, 1:100:10 y 1:100:100) por 2 h en medio sin antibiótico. Los monocitos fueron luego lavados, resuspendidos en medio suplementado con Gentamicina (100 µg/ml) y Estreptomicina (50 µg/ml) e incubados por diferentes tiempos, tal como indica la figura. En todos los casos, los

monocitos fueron luego lisados con una solución de Tritón X-100 (0,01% v/v) y el lisado fue plaqueado en Tripteína-Soja Agar suplementado con extracto de levadura. Pasados 4 días se realizó el recuento de UFC.

Recuento intracelular en PMN

Neutrófilos aislados fueron infectados con *B. abortus* en ausencia o presencia de plaquetas a diferentes concentraciones (PMN: *Ba*: PLT 1:10:10 y 1:10:100) por 1 h en medio sin antibiótico. Los PMN fueron luego lavados, resuspendidos en medio suplementado con Gentamicina (100 µg/ml) y Estreptomicina (50 µg/ml) e incubados por diferentes tiempos, tal como indica la figura. En todos los casos, los PMN fueron luego lisados con una solución de Tritón X-100 (0,01% v/v) y el lisado fue plaqueado en Tripteína-Soja Agar suplementado con extracto de levadura. Pasados 4 días se realizó el recuento de UFC.

Como control, en paralelo a la infección de PMN se realizó el recuento de UFC proveniente de plaquetas infectadas en ausencia de PMN. El número de bacterias recuperado en este caso resultó despreciable y no se vio modificado a lo largo del tiempo. Sin embargo, esta posible contribución de las plaquetas fue extraído del recuento final de UFC.

Recuentro extracelular en PMN

Neutrófilos aislados fueron infectados con *B. abortus* en ausencia o presencia de plaquetas a diferentes concentraciones (PMN: *Ba*: PLT 1:10:10 y 1:10:100) por 1, 2 o 3 h en medio sin antibiótico. Luego de la incubación, los PMN fueron separados por centrifugación. Los sobrenadantes libres de células fueron plaqueados en Tripteína-Soja Agar suplementado con extracto de levadura. Pasados 4 días se realizó el recuento de UFC.

Cuantificación de la activación plaquetaria

Ensayo de Binding de Fibrinógeno

Plaquetas lavadas fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente con *B. abortus* (PLT: *Ba* 1:10) o Trombina (0,1 U/ml final) en presencia de fibrinógeno conjugado a Alexa 488 (dilución final 1:200). Luego, las plaquetas fueron fijadas con PFA 4% y el *binding* de fibrinógeno fue cuantificado por citometría de flujo.

Ensayo de expresión de P-Selectina

Plaquetas lavadas fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente con *B. abortus* (PLT: *Ba* 1:10) o Trombina (0,1 U/ml final). Luego, las plaquetas fueron marcadas con un anticuerpo anti-P-selectina humana conjugado a FICT (*BD Biosciences*) o su control de isotipo y la expresión de P-selectina en superficie fue cuantificada mediante citometría de flujo.

Cuantificación de Complejos en Sangre Entera

Sangre entera proveniente de dadores sanos fue infectada *in vitro* con *B. abortus* durante 30 min a 30°C. En otro set de experimentos, se utilizó sangre entera proveniente de dadores sanos o pacientes con brucelosis. En todos los casos, las muestras de sangre fueron marcadas con un anticuerpo anti-CD61PE (*BD Biosciences*)

y un anticuerpo anti-CD14PerCP (*Biolegend*), anti-CD3FITC (*BD Biosciences*) o anti-CD19PerCP (*BD Biosciences*) y fijadas. Finalmente, los glóbulos rojos fueron lisados con la solución comercial BD FACS® *Lysing Solution* (*BD Biosciences*) y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. La información fue analizada utilizando el programa FlowJo® V10 (*LLC*).

Citometría de Flujo

Células THP-1, monocitos de sangre periférica, PMN, o células endoteliales fueron infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas, según lo especificado en cada figura. En otro set de experimentos, los diferentes tipos celulares fueron tratados con sobrenadante proveniente de plaquetas infectadas. En todos los casos, pasado el tiempo de incubación correspondiente, las células fueron lavadas y marcadas con un anticuerpo anti-CD54PE (clone HA58; *BioLegend*), anti-CD11bPE (*BioLegend*), anti-CD62LFITC (*ImmunoTools*) o su control de isotipo. Luego de la marcación, las células fueron analizadas utilizando un citómetro FACSCalibur® (*BD Biosciences*) y la información obtenida fue analizada utilizando el programa FlowJo® V10 (*LLC*).

ELISA

La concentración de IL-6 (*BD Biosciences*), IL-8 (*BioLegend*) y MCP-1 (*BD Biosciences*) fue cuantificada en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA de tipo *Sándwich*, utilizando pares de anticuerpos específicos para cada citoquina de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Producción de Especies Reactivas de Oxígeno

La producción de especies reactivas de oxígeno fue analizada mediante el uso de un derivado de la Rodamina denominado DHR-123, tal como fue descripto previamente[148]. Brevemente, los neutrófilos aislados fueron incubados con DHR-123 (1 μM) por 15 min a 37°C. Luego, las células fueron infectadas con *B. abortus* en ausencia o presencia de plaquetas por 30 min adicionales. Inmediatamente después de la incubación, la fluorescencia verde de la sonda fue analizada por citometría de flujo.

Ensayos de Quimiotaxis

Monocitos o neutrófilos aislados y resuspendidos en RPMI 2% fueron sembrados en el compartimento superior de una placa de *transwell* (membrana de policarbonato con poros de 5 y 3 μm, respectivamente) (*Corning*). En el compartimento inferior se colocaron 230 μl de sobrenadantes provenientes de Plaquetas, *B. abortus* o Plaquetas infectadas como estímulo quimioatractante. Las placas fueron incubadas durante 3 h en estufa a 37°C. Por último, se recuperó el líquido del compartimento inferior y se realizó el recuento de células migradas. La información se expresó como porcentaje de células migradas con respecto a las sembradas.

Ensayos de Transmigración

Para los ensayos de transmigración de células mononucleares de sangre periférica y/o neutrófilos se utilizaron placas de *transwell* con insertos de 3 µm de poro y 6,5 mm de diámetro *(Corning-Costar)*. La membrana presente en el pocillo superior fue pretratada con colágeno de cola de rata (50 mg/ml en solución 1% de ácido acético) (*BD Biosciences*) neutralizada en un ambiente saturado de hidróxido de amonio. Una vez lavadas las membranas, se estableció el modelo de barrera hematoencefálica sembrando células de la línea HBMEC en el pocillo superior y cultivándolas durante 5 días hasta confluencia.

Transmigración por activación endotelial

Una vez establecidas, las monocapas fueron estimuladas por 24 h con sobrenadantes provenientes de Plaquetas, *B. abortus* o Plaquetas infectadas con *B. abortus*. Como controles se utilizaron monocapas de HBMEC sin tratar. Luego, células mononucleares de sangre periférica o neutrófilos purificados fueron sembrados en el pocillo superior e incubados por 3 h a 37°C. Finalmente, se recolectó el medio contenido en el pocillo inferior y se realizó el recuento de las células migradas.

Transmigración directa

Una vez establecidas las monocapas, células mononucleares de sangre periférica fueron sembradas en el pocillo superior del *transwell* en presencia de plaquetas y/o *B. abortus*. Pasadas 4 h de incubación, se recolectó el medio contenido en el pocillo inferior y se realizó el recuento de células migradas. Como control se utilizaron monocapas de HBMEC pretratadas con sobrenadantes provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus* y células mononucleares sin infectar.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de la varianza de uno o dos factores (ANOVA) con un *post-hoc* test de Tukey utilizando el software GraphPad Prism versión 5.00.

Resultados Parte I

Las plaquetas promueven la infección y establecen complejos con los monocitos infectados

Anteriormente, en nuestro laboratorio demostramos que las plaquetas son capaces de modular la infección de monocitos humanos. Para evaluar la capacidad de las plaquetas para modular la infectividad de *B. abortus*, células de la línea THP-1 fueron infectadas con *B. abortus*-GFP por 4 h en presencia o ausencia de plaquetas y posteriormente se analizaron las muestras por microscopía confocal. La presencia de plaquetas aumentó significativamente los porcentajes de células THP-1 infectadas (GFP^+) (Figura 1A-C). A su vez, este fenómeno fue reproducido utilizando monocitos obtenidos a partir de sangre periférica (Figura 1D).

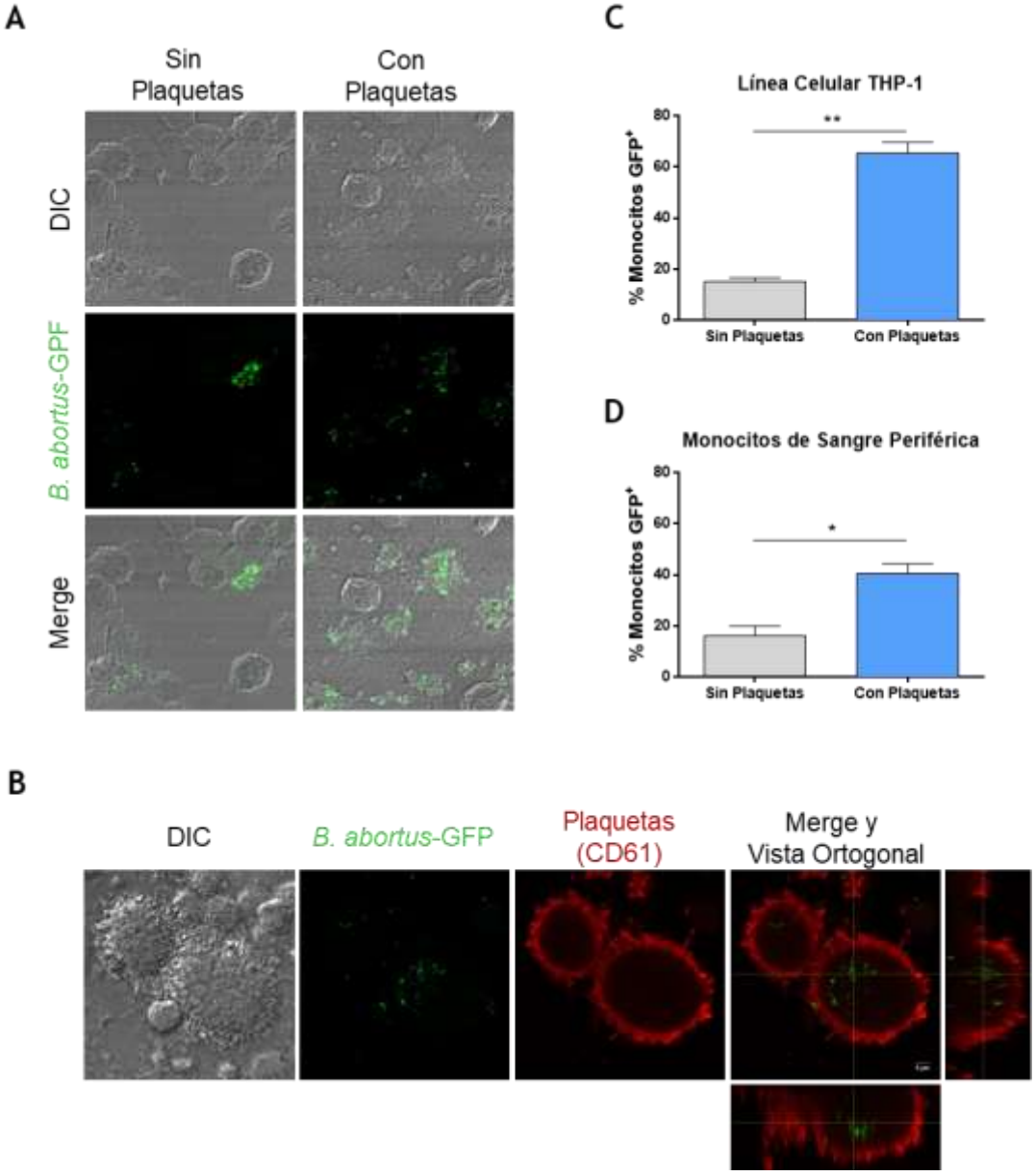


Figura 1. Las plaquetas promueven la invasión de monocitos humanos por *Brucella abortus*. (A) Micrografías confocales de células THP-1 infectadas con una cepa de *B. abortus* que expresa la Proteína Fluorescente Verde (*B. abortus*-GFP) en presencia o ausencia de plaquetas por 4 h. **(B)** Micrografías confocales de células THP-1 infectadas con *B. abortus*-GFP en presencia de plaquetas por 4 h. Las plaquetas fueron marcadas con un anticuerpo primario

anti-CD61 humano seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). **(C)** Cuantificación de la invasión de células THP-1 por parte de *B. abortus*. **(D)** Cuantificación de la invasión de monocitos purificados a partir de sangre periférica por parte de *B. abortus*. Los datos fueron expresados como porcentaje de monocitos invadidos (monocitos GFP-positivos) ± SEM de tres experimentos independientes. La cantidad de células cuantificadas por grupo experimental fue de 200. THP-1: PLT: *Ba* 1:100:100. *$P < 0.05$; ** $P < 0.01$ *vs.* monocitos infectados en ausencia de plaquetas.

Una vez demostrada la capacidad de las plaquetas para promover la infección de monocitos, nos preguntamos cómo era el juego de interacciones entre estas poblaciones celulares. Para analizar esto, células THP-1 fueron incubadas con plaquetas en presencia o ausencia de *B. abortus*-GFP (THP-1: *Ba*: PLT 1:100:100) durante 4 h. Luego, los monocitos fueron marcados utilizando un anticuerpo monoclonal anti-MHC-I (azul) y las plaquetas con un anti-CD61 (rojo). Finalmente, las muestras se analizaron por microscopia confocal. Como se puede ver en la Figura 2A, las plaquetas son capaces de establecer interacciones con monocitos dando lugar a la formación de complejos mixtos en presencia de *B. abortus*. Resulta interesante destacar que las plaquetas se observaron asociadas a los monocitos infectados (monocitos positivos para *Ba*) (Figura 2B). Para cuantificar este fenómeno de formación de complejos mediados por *B. abortus*, se determinó la cantidad de monocitos presentes en el campo y se analizó cuáles de ellos se encontraban infectados (*Ba* positivos), cuáles no lo estaban (*Ba* negativos), cuáles se encontraban asociados a plaquetas (PLT positivos) y cuáles no lo estaban (PLT negativos). Una vez analizados todos los monocitos de la región, se representó gráficamente el porcentaje de monocitos dobles negativos (no infectados y no asociados a plaquetas), dobles positivos (infectados y asociados a plaquetas) y simples positivos (asociados a plaquetas, pero no infectados; o infectados, pero no asociados a plaquetas). Solamente los monocitos infectados se encontraron formando complejos mixtos con las plaquetas (Figura 2C). Más aun, como se puede ver en la Figura 2D y en el Video Suplementario 1, las plaquetas se disponen rodeando completamente al monocito infectado.

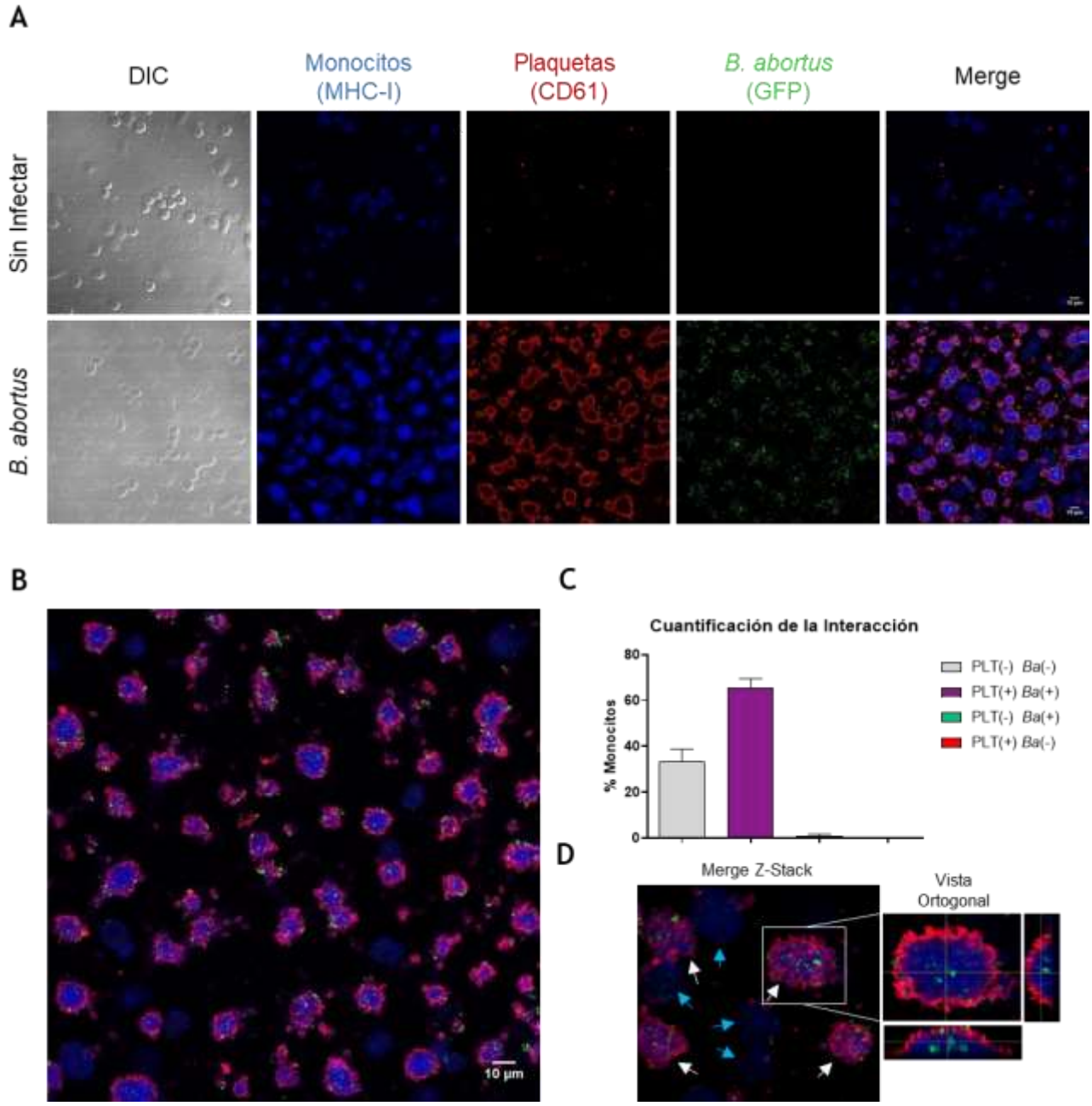


Figura 2. Las plaquetas establecen complejos con los monocitos infectados. (A) Micrografías confocales de células THP-1 infectadas con *B. abortus*-GFP en presencia o ausencia de plaquetas por 4 h. Los monocitos fueron marcados con un anticuerpo primario anti-MHC-I humano, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 633 (azul). Las plaquetas fueron marcadas con un anticuerpo primario anti-CD61 humano seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). **(B)** Micrografía confocal panorámica de células THP-1 infectadas con *Ba*-GFP en presencia de plaquetas, imagen representativa de las adquiridas para la cuantificación de la interacción. **(C)** Cuantificación de la interacción entre poblaciones. Las subpoblaciones de monocitos fueron clasificadas como: no infectadas y no asociadas a plaquetas (*doble negativas*), invadidas y asociadas a plaquetas (*doble positivas*), sólo invadidas (*GFP-positivas*), y sólo asociadas a plaquetas (*CD61-positivas*). Los datos fueron expresados como porcentaje de monocitos ± SEM de tres experimentos independientes. La cantidad de células cuantificadas por grupo experimental fue de 200. **(D)** *Merge, Z-stack* y vistas ortogonales de células THP-1 infectadas con *B. abortus*-GFP en presencia de plaquetas por 4 h. Las flechas azules

indican células THP-1 no invadidas mientras que las flechas blancas indican células THP-1 invadidas y rodeadas de plaquetas. THP-1: PLT: *Ba* 1:100:100.

Las plaquetas interaccionan directamente con *B. abortus*

Teniendo en cuenta nuestros resultados previos, el primer objetivo de esta tesis fue investigar si existe una interacción directa entre plaquetas y *B. abortus*. Para esto, plaquetas lavadas fueron co-incubadas por 4 h con *B. abortus*-GFP a diferentes concentraciones (PLT: *Ba* 1:1, 1:10 y 1:30). Luego, las plaquetas fueron marcadas con un anticuerpo anti-CD61 (rojo) y se analizó la interacción entre ambas poblaciones por microscopía confocal (Figura 3A y B) y por citometría de flujo (Figura 3C). *B. abortus* fue capaz de unirse directamente a las plaquetas y esta interacción aumenta de manera dosis-dependiente (Figura 3A-C).

Dado que diversas bacterias son capaces de alterar la función plaquetaria[149], evaluamos si la interacción física con *B. abortus* modulaba alguna respuesta funcional en las plaquetas. Para ello, incubamos plaquetas lavadas con *B. abortus* y cuantificamos la activación plaquetaria por citometría de flujo. La presencia de *B. abortus* indujo un aumento significativo tanto del *Binding* de Fibrinógeno como de la expresión en superficie de P-selectina (Figura 3D y E). Si bien *B. abortus* induce una potente activación de las plaquetas, la respuesta es menor que la observada frente a la activación con Trombina, uno de sus principales agonistas (Figura 3D y E).

A continuación, nos preguntamos si las plaquetas podían ser invadidas por *B. abortus*. Para responder este interrogante, las plaquetas fueron incubadas con diferentes multiplicidades de infección (MOI) de *B. abortus* por 2 h. Pasado ese tiempo, se adicionó antibiótico al medio de cultivo para eliminar las bacterias no internalizadas, se lisaron las plaquetas y se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) intracelulares. Como se muestra en la Figura 3F, *B. abortus* invade las plaquetas de manera dosis-dependiente.

En conjunto, estos resultados demuestran que *B. abortus* es capaz de interactuar directamente con las plaquetas e invadirlas, gatillando mecanismos de activación plaquetaria

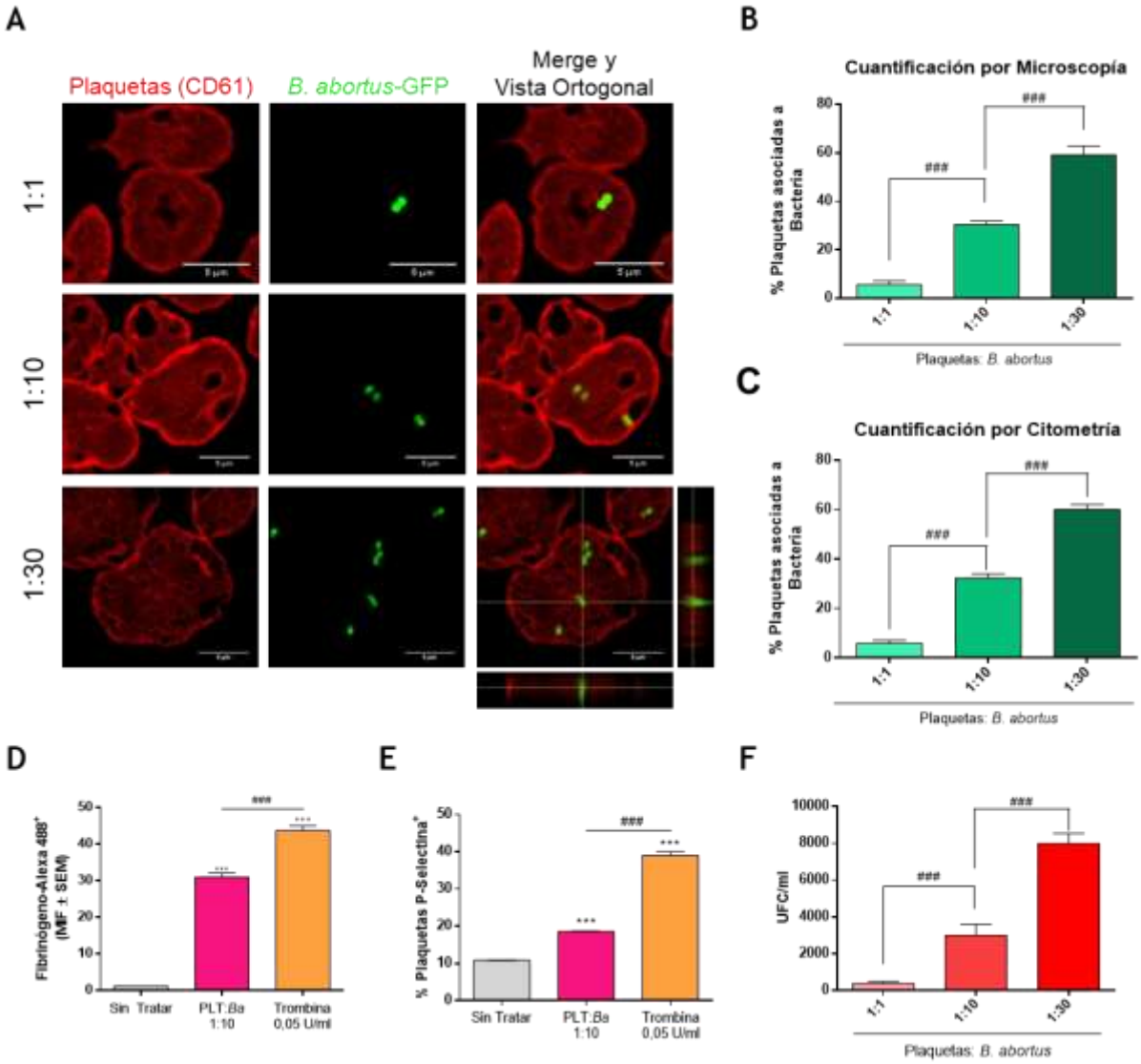


Figura 3. Las plaquetas interaccionan directamente con *B. abortus*. (A) Micrografías confocales de plaquetas incubadas con *B. abortus*-GFP en diferentes proporciones (PLT: *Ba*-GFP 1:1, 1:10 y 1:30) por 4 h. Las plaquetas fueron marcadas con un anticuerpo primario anti-CD61 humano seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). **(B)** Cuantificación de la interacción plaqueta-*B. abortus* por microscopia confocal. La cantidad de células cuantificadas por grupo experimental fue de 200. **(C)** Cuantificación de la interacción plaqueta-*B. abortus* por citometría de flujo. Los datos fueron expresados como porcentaje de plaquetas asociadas a *B. abortus* (*GFP-positivas*) ± SEM de tres experimentos independientes. Las plaquetas también fueron incubadas con *B. abortus* por 30 minutos y su estado de activación fue cuantificado como *binding* de fibrinógeno **(D)** y expresión de P-selectina **(E)**. El agonista Trombina fue utilizado como control para la activación de plaquetas. Las barras representan la media aritmética ± SEM de tres experimentos independientes o el porcentaje de plaquetas que expresan P-selectina en su superficie. MIF: media de la intensidad de fluorescencia. **(F)** Cuantificación de la invasión de plaquetas por parte de *B. abortus*. Los datos fueron expresados como Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por ml. *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar; ### $P<0.001$.

Las plaquetas funcionan como *carriers* de la bacteria hacia los monocitos

La formación de complejos mixtos entre plaquetas y monocitos infectados nos llevó a postular dos posibles hipótesis acerca del mecanismo involucrado en este fenómeno: (1) la infección con *B. abortus* aumenta la expresión de algunas moléculas de superficie o receptores en la superficie de los monocitos, favoreciendo la unión específica de plaquetas; o (2) las plaquetas activadas funcionan como *carrier* de las bacterias, transportándolas hacia los monocitos y promoviendo la infección de los mismos.

Para evaluar la primera hipótesis, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus*-GFP por 2 h. Luego, las células fueron lavadas e incubadas con plaquetas por 2 h adicionales (THP-1: *Ba*: PLT 1:100:100). Como control se utilizaron monocitos incubados durante 2 en ausencia de *B. abortus* y puestos luego en contacto con plaquetas (datos no mostrados). Finalmente, las muestras fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal anti-MHC-I (azul) y un anti-CD61 (rojo) y analizadas por microscopía confocal. Como podemos ver en la Figura 4C, el porcentaje de infección obtenido en estas condiciones fue similar a la condición control de monocitos infectados en ausencia de plaquetas (Figura 4A y C). Por otro lado, si bien fue posible encontrar plaquetas adheridas a la superficie de monocitos, el número y la disposición de las mismas fue diferente a los resultados del experimento de coincubación de las tres poblaciones.

Para evaluar la segunda hipótesis, las plaquetas fueron incubadas con *B. abortus*-GFP por 2 h. Luego, células THP-1 fueron puestas en contacto con la suspensión de plaquetas infectadas con *B. abortus*-GFP por 2 h adicionales. Como control se utilizó una suspensión de plaquetas incubadas durante 2 h en ausencia de bacteria (datos no mostrados). Finalmente, las células fueron marcadas tal como fue descripto anteriormente y se analizaron por microscopia confocal. En este caso, cuando se utilizó la suspensión de plaquetas pre-infectadas con *B. abortus*, el porcentaje de infección de monocitos observado fue significativamente mayor (Figura 4B y C). Asimismo, utilizando esta aproximación experimental, se observaron complejos formados entre plaquetas y monocitos infectados (Figura 4B) en los cuales el número y la disposición de plaquetas eran similares a los observados en los experimentos de coincubación de las tres poblaciones. En concordancia con la hipótesis de la función *carrier* de las plaquetas, se puede observar la presencia de plaquetas transportando bacteria hacia los monocitos (Figura 4D, E y Video Suplementario 3).

Conjuntamente, estos resultados indican que la infección de los monocitos no induce la formación de los complejos plaqueta-monocito. En cambio, la interacción entre plaquetas y bacteria desencadena la activación plaquetaria y promueve que las plaquetas actúen como *carrier* de las bacterias hacia los monocitos. Como consecuencia, los monocitos infectados con *B. abortus* permanecen asociados a las plaquetas que favorecieron su infección.

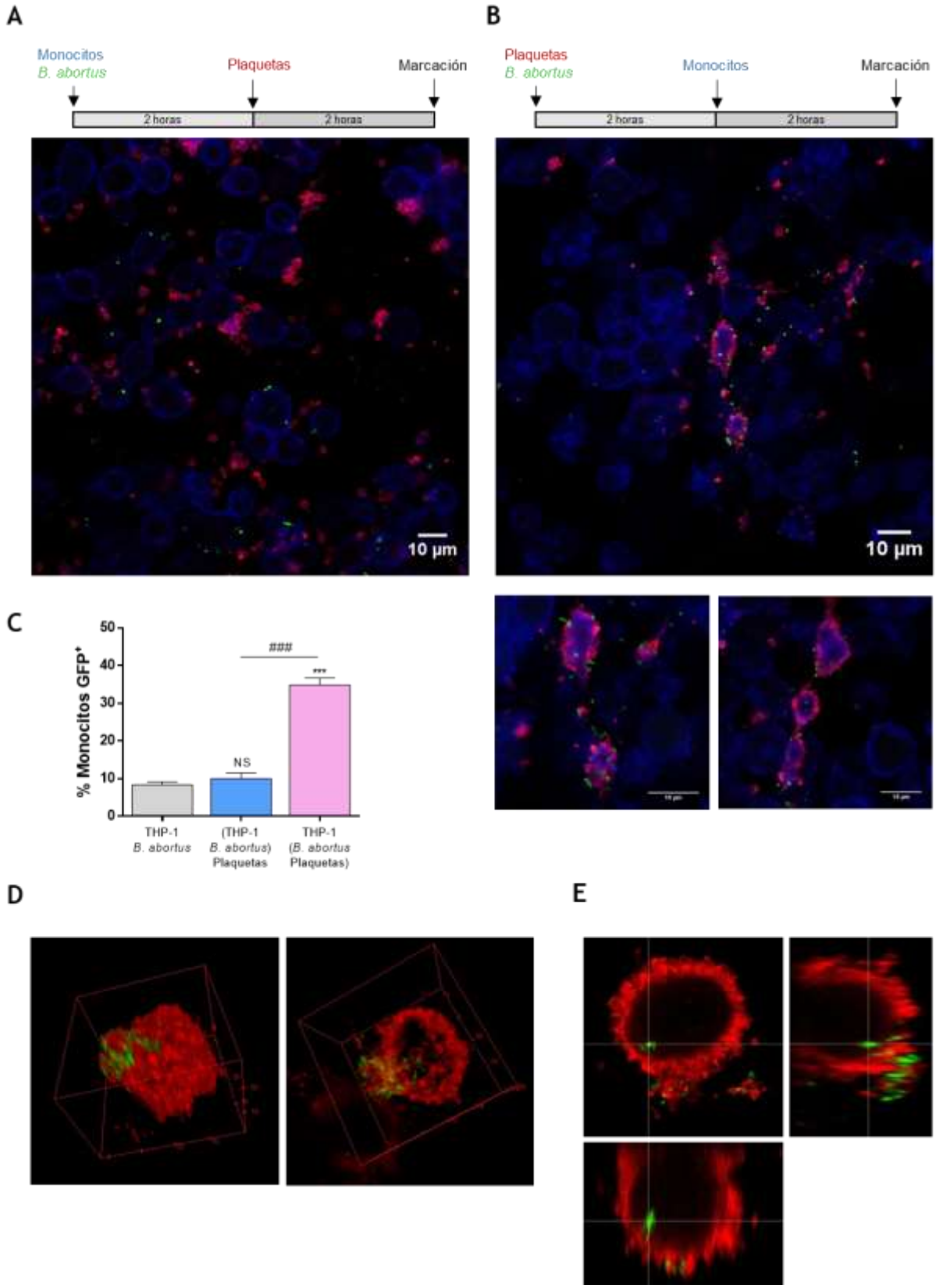


Figura 4. Las plaquetas funcionan como *carrier* de las bacterias hacia los monocitos. (A) Micrografía confocal de células THP-1 incubadas con *B. abortus*-GFP por 2 h y luego incubadas con plaquetas por 2 h adicionales. **(B)** Plaquetas fueron incubadas con *B. abortus*-GFP por 2 h. Células THP-1 fueron luego incubadas con la suspensión de plaquetas y *B. abortus*-GFP por 2 h adicionales. Los monocitos fueron marcados con un anticuerpo primario anti-MHC-I

humano, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 633 (azul). Las plaquetas fueron marcadas con un anticuerpo primario anti-CD61 humano seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. **(C)** Cuantificación de la invasión de células THP-1 por *B. abortus*-GFP en tres condiciones experimentales: monocitos infectados con *B. abortus*-GFP en ausencia de plaquetas, y en las condiciones experimentales descriptas en los paneles A y B. Los datos fueron expresados como porcentaje de monocitos invadidos (*GFP-positivos*) ± SEM de tres experimentos independientes. La cantidad de células cuantificadas por grupo experimental fue de 200. NS: no significativo; *** $P<0.001$ *vs.* THP-1 + *B. abortus*; ### $P<0.001$. **(D y E)** Plaquetas fueron incubadas con *B. abortus*-GFP por 2 h. Células THP-1 fueron luego incubadas con la suspensión de plaquetas y *B. abortus*-GFP por 2 h adicionales. Las plaquetas fueron marcadas con un anticuerpo primario anti-CD61 humano seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). Reconstrucción en 3 dimensiones **(D)**, *Merge* del *Z-stack* y vistas ortogonales **(E)**. THP-1: PLT: *Ba* 1:100:100.

Factores solubles liberados por las plaquetas median la modulación de CD54 en monocitos

Previamente, demostramos que la presencia de plaquetas modula la secreción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias y la expresión en superficie de moléculas de adhesión y coestimulatorias en los monocitos infectados por *B. abortus*. Entre las moléculas inducidas se encuentra CD54 (ICAM-1). Esta molécula de adhesión suele verse aumentada en la membrana de monocitos bajo condiciones inflamatorias[150] y ha sido involucrada en la formación de complejos entre leucocitos y en la adhesión al endotelio[151].

Teniendo en cuenta la importancia de CD54 para la migración y funcionalidad de monocitos en el tejido infectado, durante la realización de esta tesis nos preguntamos si la modulación por plaquetas requería el contacto físico entre las células o si se encontraba mediada por factores solubles. Para responder esto, THP-1 fueron estimuladas con medios condicionados provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus*. Como control, se utilizaron células THP-1 tratadas con sobrenadantes provenientes de bacterias solas. Luego, la expresión de CD54 en los monocitos fue cuantificada por citometría de flujo (Figura 5A y B). La estimulación con el sobrenadante proveniente de plaquetas infectadas fue suficiente para la inducción de la expresión de CD54 en monocitos, a diferencia de los sobrenadantes de plaquetas y bacterias solas (Figura 5B). Este resultado indica la presencia de factores solubles involucrados en la modulación de CD54 y sugiere que el contacto directo entre plaquetas y monocitos es dispensable en la modulación de, al menos, esta molécula de adhesión.

Entre los diversos mediadores liberados por las plaquetas activadas, CD40L soluble (sCD40L), *Platelet Factor 4* (PF4), *Platelet Activating Factor* (PAF), y Tromboxano A_2 (TXA_2) han sido previamente involucrados en la formación de complejos plaqueta-monocito en diversos contextos infecciosos[77,152,153]. Por lo tanto, nos propusimos evaluar el posible rol de estos factores en la modulación de monocitos mediada por plaquetas en el contexto de la infección por *B. abortus*. Para esto, realizamos experimentos de neutralización y/o de estimulación con factores recombinantes, para luego evaluar la expresión de CD54 en la superficie de

monocitos. En primer lugar, células THP-1 fueron incubadas con sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas en presencia o ausencia de un anticuerpo neutralizante anti-sCD40L. La neutralización de sCD40L generó una reversión parcial de la inducción de CD54 mediada por el sobrenadante de plaquetas infectadas (Figura 5C). Confirmando este resultado, la estimulación de células THP-1 con sCD40L recombinante incrementó leve pero significativamente la expresión de CD54 en monocitos (Figura 5D). A continuación, células THP-1 fueron tratadas con sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas en presencia o ausencia de un anticuerpo neutralizante de PF4. La neutralización de PF4 también redujo de forma parcial la inducción de CD54 mediada por el sobrenadante de plaquetas infectadas con *B. abortus* (Figura 5E). En línea con este resultado, el tratamiento con PF4 recombinante indujo levemente la expresión de CD54 en monocitos (Figura 5F). Para evaluar el papel de PAF, células THP-1 fueron incubadas con la versión recombinante de este mediador. La exposición de células THP-1 a PAF recombinante provocó un leve pero significativo aumento en la expresión de CD54 (Figura 5G). Dada la falta de inhibidores o bloqueantes de TXA_2, la estrategia utilizada para dilucidar su rol fue diferente. En este caso, se recolectaron sobrenadante de plaquetas infectadas en presencia o ausencia de aspirina, un inhibidor de la ciclooxigenasa, y esos sobrenadantes fueron utilizados para la estimulación de células THP-1. La inhibición de la formación de TXA_2 durante la obtención de los sobrenadantes, revirtió parcialmente la inducción de CD54 en superficie de monocitos (Figura 5H). Por último, la inducción de CD54 observada por la utilización combinada de sCD40L, PF4 y PAF recombinantes fue más potente que la inducción obtenida por cada factor individual por separado (Figura 5I). La utilización de aspirina durante la obtención de sobrenadantes de plaquetas infectadas junto con la posterior neutralización con anticuerpos anti-sCD40L y anti-PF4 permitió revertir completamente la inducción de CD54 en monocitos (Figura 5J).

En conjunto, nuestros resultados demuestran que no hay un único factor involucrado en la modulación de CD54 por plaquetas en el contexto de la infección con *B. abortus*. Por el contrario, diversos factores como sCD40L, PF4, PAF y TXA_2 contribuyen de manera parcial y simultánea en este fenómeno.

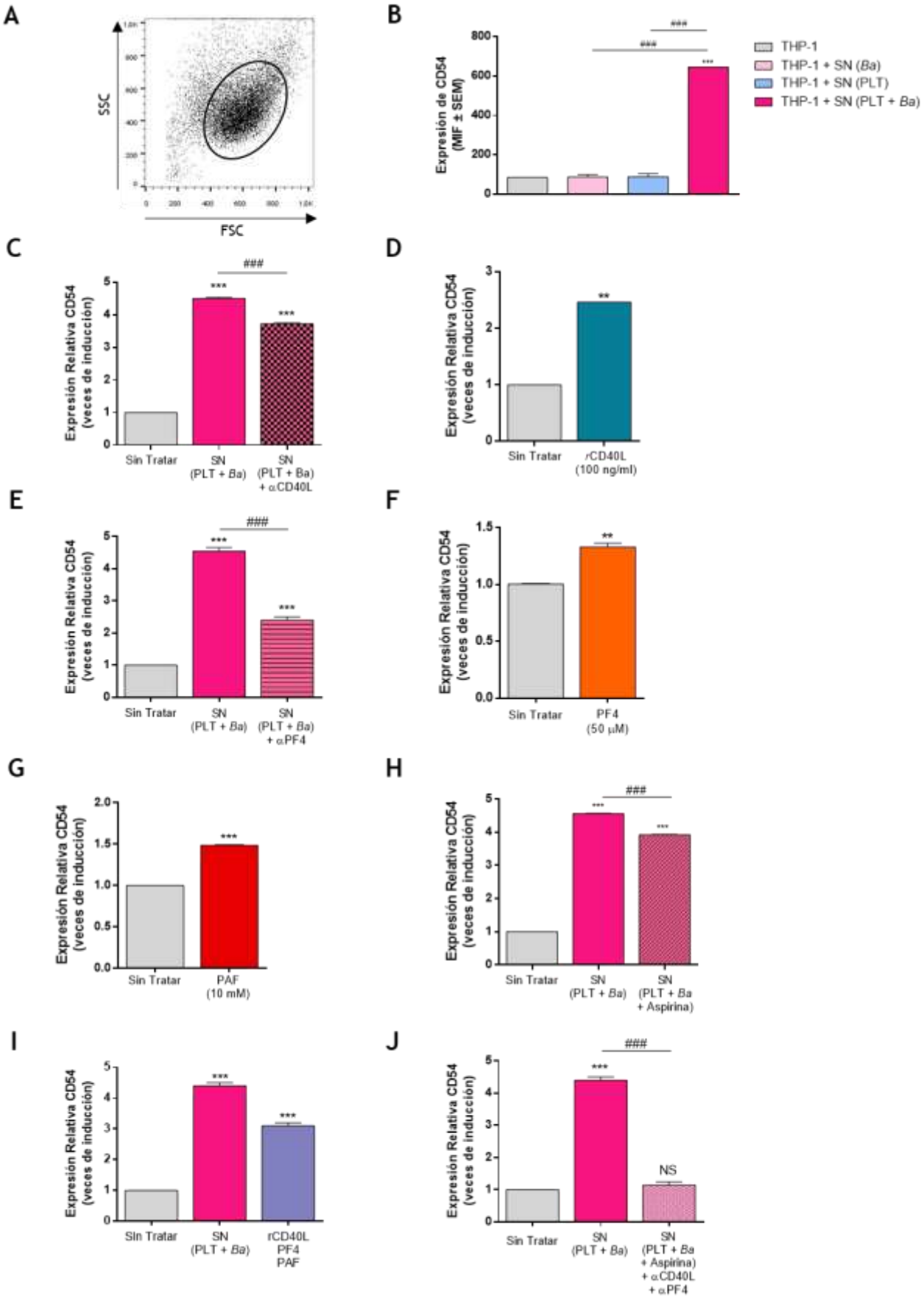

A
SSC
FSC
B
Expresión de CD54 (MIF ± SEM)
THP-1
THP-1 + SN (Ba)
THP-1 + SN (PLT)
THP-1 + SN (PLT + Ba)
C
Expresión Relativa CD54 (veces de inducción)
Sin Tratar
SN (PLT + Ba)
SN (PLT + Ba) + αCD40L
D
Expresión Relativa CD54 (veces de inducción)
Sin Tratar
rCD40L (100 ng/ml)
E
Expresión Relativa CD54 (veces de inducción)
Sin Tratar
SN (PLT + Ba)
SN (PLT + Ba) + αPF4
F
Expresión Relativa CD54 (veces de inducción)
Sin Tratar
PF4 (50 μM)
G
Expresión Relativa CD54 (veces de inducción)
Sin Tratar
PAF (10 mM)
H
Expresión Relativa CD54 (veces de inducción)
Sin Tratar
SN (PLT + Ba)
SN (PLT + Ba + Aspirina)
I
Expresión Relativa CD54 (veces de inducción)
Sin Tratar
SN (PLT + Ba)
rCD40L PF4 PAF
J
Expresión Relativa CD54 (veces de inducción)
Sin Tratar
SN (PLT + Ba)
SN (PLT + Ba + Aspirina) + αCD40L + αPF4
NS

Figura 5. Factores solubles liberados por las plaquetas median la modulación de CD54 en monocitos. Células THP-1 fueron estimuladas con sobrenadantes recolectados de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus* y analizadas por citometría de flujo. La población de monocitos fue identificada en un FSC *vs.* SSC *dot plot* **(A)** y la expresión de CD54 fue cuantificada dentro de la región **(B)**. Sobrenadantes recolectados a partir de bacterias incubadas solas fueron utilizados como control. Las barras representan la media aritmética ± SEM de tres experimentos independientes. MIF: media de la intensidad de fluorescencia. Células THP-1 fueron incubadas con sobrenadantes de plaquetas infectadas en presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes para CD40L soluble (sCD40L) **(C**) o PAF **(E)**. Células THP-1 fueron estimuladas con sCD40L **(D)**, PF4 **(F)** o PAF **(G)** en sus formas recombinante**. (H)** Células THP-1 fueron tratadas con sobrenadantes recolectados de plaqueta infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de aspirina. **(I)** Células THP-1 fueron estimuladas con una combinación de sCD40L, PF4 y PAF. **(J)** Células THP-1 fueron tratadas con sobrenadantes recolectados de plaquetas infectadas en presencia de aspirina más anticuerpos neutralizantes anti-CD40L y anti-PF4. En todos los casos, la expresión de CD54 en superficie de monocitos fue analizada por citometría de flujo para todos los tratamientos. Las barras representan las veces de inducción de CD54 ± SEM de tres experimentos independientes. THP-1: PLT: *Ba* 1:100:100. ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar. ### $P<0.001$. NS: no significativo.

Las plaquetas promueven la invasión de monocitos y favorecen la contención bacteriana

Como mencionamos anteriormente, la presencia de plaquetas durante la infección con *B. abortus* no solo favorece la infección de los monocitos, sino que también modula la funcionalidad de los mismos. Por este motivo, nos preguntamos si la presencia de plaquetas podía modular el curso de la infección con *B. abortus*. Para responder este interrogante, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas en diferentes concentraciones por 4 h. Luego, se eliminó toda la bacteria no internalizada mediante el agregado de antibióticos y las células se mantuvieron en cultivo durante 24, 48 o 72 h adicionales. Pasado el tiempo correspondiente, los monocitos fueron lisados para realizar el recuento de UFC. Como se puede observar en la Figura 6A, y de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 1, la presencia de plaquetas aumentó significativamente el porcentaje de células THP infectadas con *B. abortus*. Sin embargo, la presencia de plaquetas también aumentó la contención de la infección a tiempos prolongados (Figura 6B). Este resultado demuestra que, a pesar de favorecer la invasión, las plaquetas promueven la contención bacteriana dentro de los monocitos infectados.

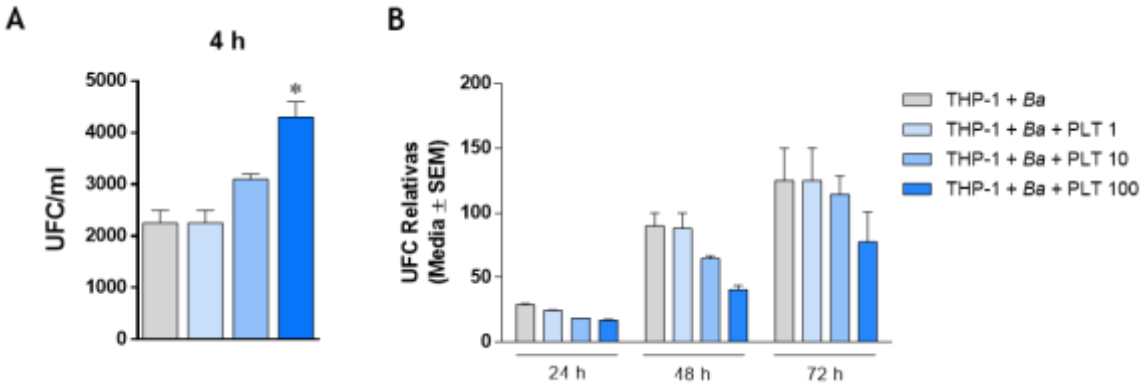


Figura 6. Las plaquetas promueven la invasión de monocitos y favorecen la contención bacteriana. Células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* en ausencia o presencia de plaquetas en diferentes proporciones (THP-1: PLT: 1:1, 1:10 y 1:100) por 4 h, y luego incubadas con antibióticos por 24, 48 o 72 h adicionales. **(A)** Cuantificación de la invasión de monocitos por parte de *B. abortus* luego de 4 h de incubación. La información esta expresada como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml. **(B)** Cuantificación de la invasión de monocitos por parte de *B. abortus* a diferentes tiempos post-infección. Los resultados fueron expresados como UFC por ml en cada punto, relativizada al recuento de UFC por ml obtenido para la misma condición a 4 h. * $P<0.05$ *vs.* THP-1 + *Ba*

Las plaquetas forman complejos con monocitos en sangre entera

Retomando nuestros resultados previos acerca de la formación de complejos entre plaquetas y monocitos infectados, nos preguntamos si estos complejos mixtos también podían establecerse en sangre periférica. Para esto, sangre entera proveniente de dadores sanos fue incubada con *B. abortus* y marcada con un anticuerpo monoclonal anti-CD14PerCP y anti-CD61PE. Luego, se analizó la presencia de complejos plaqueta-monocito ($CD14^+CD61^+$) dentro de la región de monocitos ($CD14^+$) por citometría de flujo (Figura 7A-C). Tal como se observa en la Figura 7A-C, *B. abortus* es capaz de aumentar no solo el porcentaje de monocitos adheridos a plaquetas (% de células doble positivas $CD14^+CD61^+$) sino también la cantidad de plaquetas adheridas por monocito (expresión de CD61 en células del cuadrante $CD14^+CD61^+$) (Figura 7D).

En conjunto, estos resultados demuestran que la presencia de *B. abortus* promueve el establecimiento de complejos entre plaquetas y monocitos durante la infección *in vitro*.

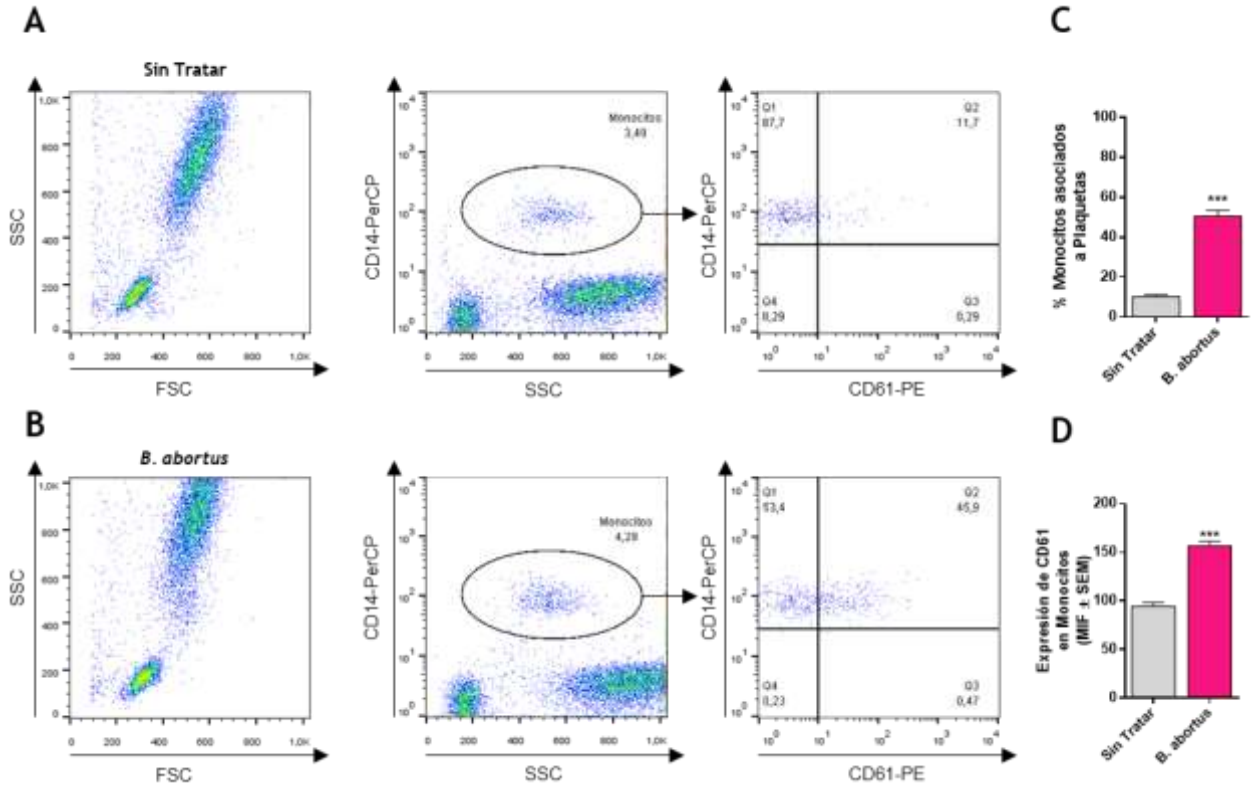


Figura 7. Las plaquetas forman complejos con monocitos en sangre entera. Análisis por citometría de flujo de sangre entera sin infectar **(A)** o infectada *in vitro* con *B. abortus* por 30 min **(B)**. Las muestras de sangre fueron marcadas con anticuerpos anti-CD61PE y anti-CD14PerCP humanos y analizadas por citometría de flujo para identificar complejos plaqueta-monocito. **(C)** Cuantificación de los complejos plaqueta-monocito. Los datos fueron expresados como porcentaje de monocitos asociados a plaquetas ($CD14^+CD61^+$) ± SEM de tres experimentos independientes. **(D)** Expresión de CD61 cuantificada en monocitos asociados a plaquetas. Las barras representan la media aritmética ± SEM de tres experimentos independientes. MIF: media de la intensidad de fluorescencia. *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar.

Los complejos plaqueta-monocito se encuentran elevados en pacientes con brucelosis

Una vez confirmado el aumento en la formación de complejos en sangre periférica en el contexto de la infección *in vitro*, nos preguntamos si ocurría lo mismo en un contexto de infección por *Brucella in vivo*. De esta manera, evaluamos la presencia de complejos plaqueta-monocito circulantes en sangre periférica de pacientes con brucelosis crónica. Para esto, sangre entera proveniente de dadores sanos o pacientes con brucelosis fue marcada con un anticuerpo anti-CD14PerCP y un anticuerpo anti-CD61PE y se analizó la presencia de complejos plaqueta-monocito ($CD14^+CD61^+$) dentro de la región de monocitos ($CD14^+$) por citometría de flujo (Figura 8A). Como se puede observar en la Figura 8B, los pacientes con brucelosis presentan un número elevado de complejos circulantes.

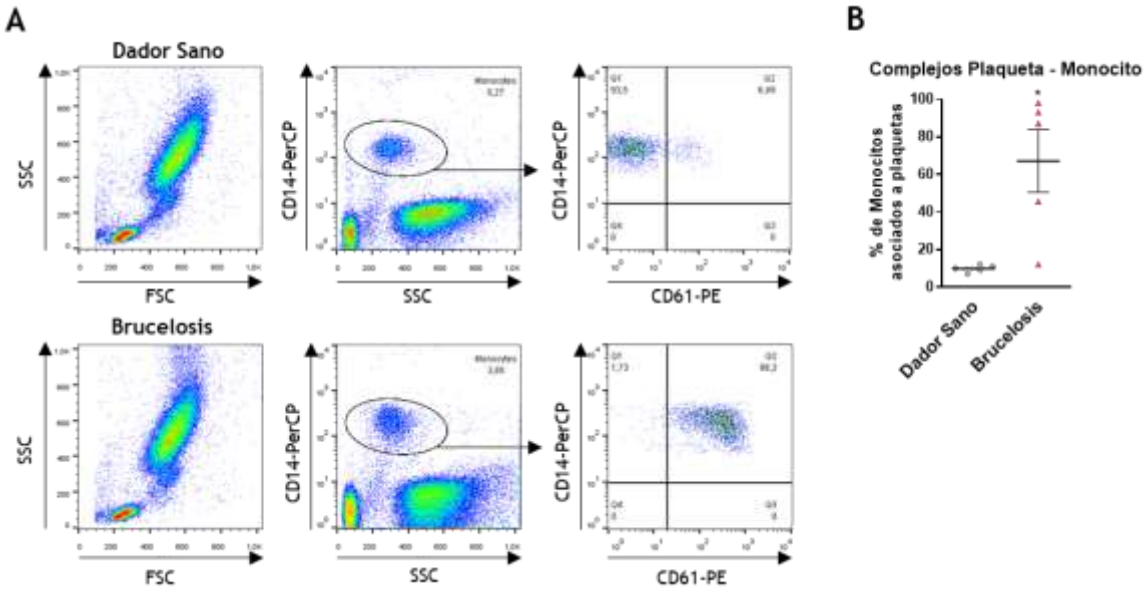


Figura 8. Los complejos plaqueta-monocito se encuentran elevados en pacientes con brucelosis. (A) Análisis por citometría de flujo de sangre entera de dadores sanos o pacientes con brucelosis crónica. Las muestras de sangre fueron marcadas con anticuerpos anti-CD61PE y anti-CD14PerCP humanos y analizadas por citometría de flujo para identificar complejos plaqueta-monocito. **(B)** Cuantificación de los complejos plaqueta-monocito. Los datos fueron expresados como porcentaje de monocitos asociados a plaquetas ($CD14^+CD61^+$) ± SEM de cinco experimentos independientes. Cada punto representa un dador independiente. * $P<0.05$ *vs.* Dador sano.

Resultados Parte II

Los complejos plaqueta-PMN también se encuentran elevados en pacientes con brucelosis

Una vez demostrado el aumento de complejos plaqueta-monocito en sangre periférica de pacientes con brucelosis crónica, nos preguntamos si la formación de complejos mixtos se encontraba restringida a los monocitos o podía ser extendida a otras poblaciones leucocitarias, como linfocitos y/o neutrófilos. Para evaluar la presencia de complejos establecidos entre plaquetas y linfocitos, sangre entera proveniente de dadores sanos o pacientes con brucelosis fue marcada con un anticuerpo anti-CD3 o anti-CD19 y un anticuerpo anti-CD61. Luego, la presencia de complejos plaqueta-linfocito T ($CD3^+CD61^+$) o plaqueta-linfocito B ($CD19^+CD61^+$) fue analizada por citometría de flujo dentro del *gate* de linfocitos. Solamente se encontró un pequeño porcentaje de linfocitos asociados a plaquetas en la sangre proveniente de dadores sanos y pacientes con brucelosis, y no se encontraron diferencias significativas entre dichos porcentajes (Figura 9).

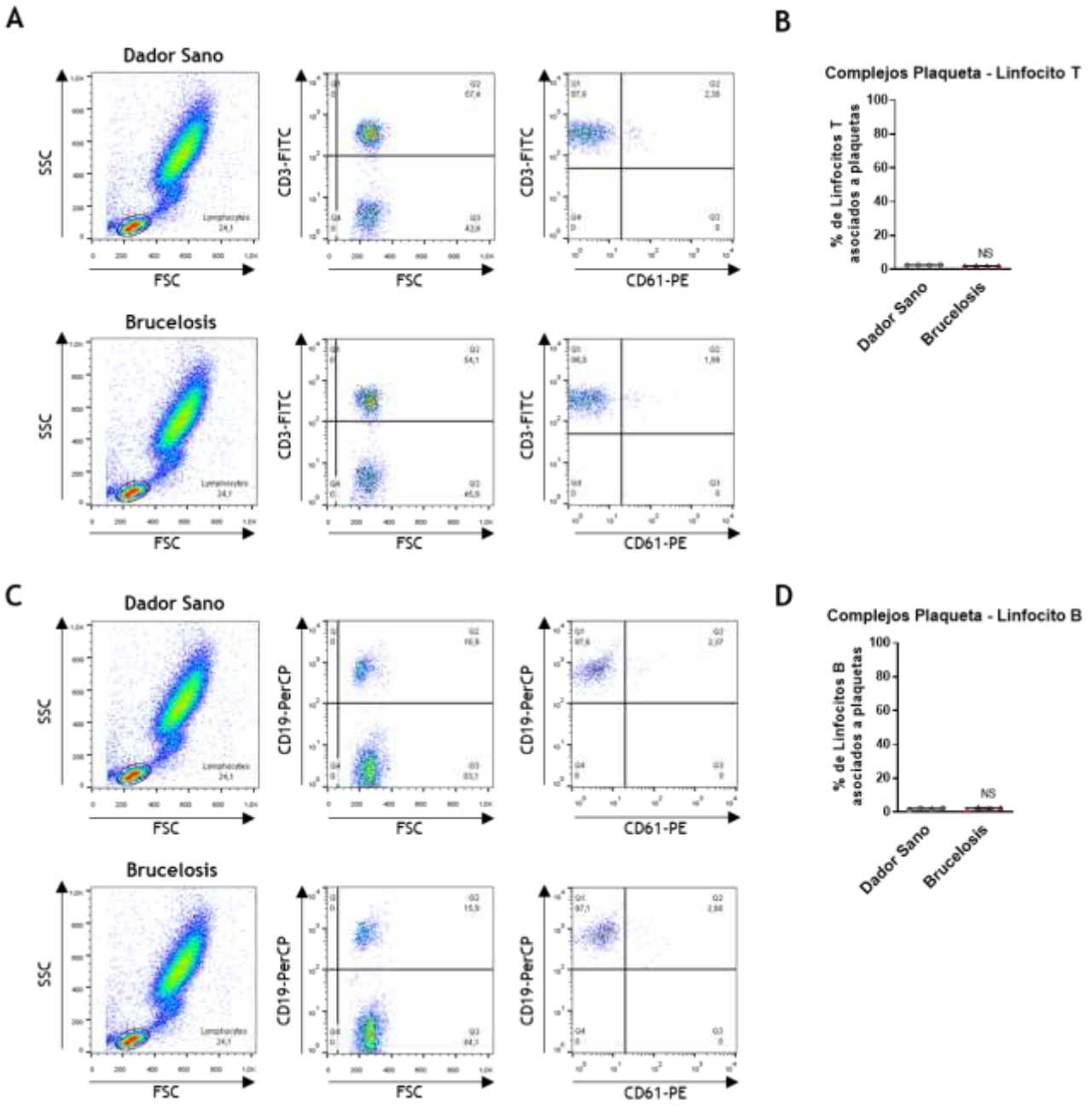


Figura 9. Los pacientes con brucelosis no presentan complejos plaqueta-linfocito. Análisis por citometría de flujo de sangre entera de dadores sanos o pacientes con brucelosis crónica. Las muestras de sangre fueron marcadas con anticuerpos anti-CD61PE y anti-CD3FITC o anti-CD19PerCP humanos y analizadas por citometría de flujo. **(A)** Estrategia de análisis para la identificación de complejos formados entre plaquetas y linfocitos T. **(B)** Cuantificación de los complejos plaqueta-linfocito T ($CD3^+CD61^+$). **(C)** Estrategia de análisis para la identificación de complejos formados entre plaquetas y linfocitos B. **(D)** Cuantificación de los complejos plaqueta-linfocito B ($CD19^+CD61^+$). Los datos fueron expresados como porcentaje de linfocitos asociados a plaquetas ± SEM de cuatro experimentos independientes. Cada punto representa un dador independiente. NS: no significativo.

Luego evaluamos la presencia de complejos entre plaquetas y células polimorfonucleares (PMN). Para ello, la sangre fue marcada de la misma manera que para las Figuras 7 y 8 y la presencia de complejos plaqueta-

PMN ($CD14^{-}CD61^{+}$) fue analizada por citometría de flujo dentro de la región de células PMN (Figura 10). Interesantemente, los pacientes con brucelosis crónica presentaron niveles de complejos plaqueta-PMN (% de células $CD14^{-}CD61^{+}$) circulantes levemente mayores que los dadores sanos (Figura 10).

En conjunto, estos resultados demuestran que los pacientes con brucelosis presentan un nivel levemente mayor de complejos establecidos tanto entre plaquetas y monocitos, como entre plaquetas y neutrófilos.

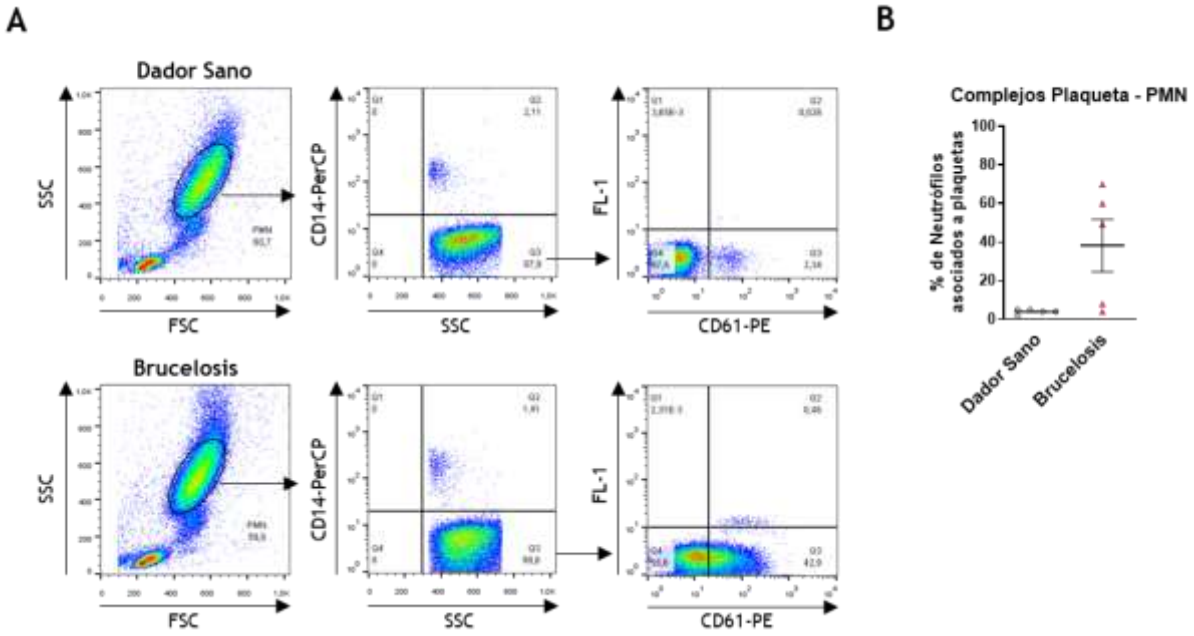


Figura 10. Los complejos plaqueta-PMN también se encuentran elevados en pacientes con brucelosis. (A) Análisis por citometría de flujo de sangre entera de dadores sanos o pacientes con brucelosis crónica. Las muestras de sangre fueron marcadas con anticuerpos anti-CD61PE y anti-CD14PerCP humanos y analizadas por citometría de flujo para identificar complejos plaqueta-PMN. **(B)** Cuantificación de los complejos plaqueta-PMN. Los datos fueron expresados como porcentaje de PMN asociados a plaquetas ($CD14^{-}CD61^{+}$ dentro de la región de PMN) ± SEM de cinco experimentos independientes. Cada punto representa un dador independiente.

B. abortus promueve el establecimiento de complejos plaqueta-PMN

La presencia de complejos plaqueta-PMN circulantes en pacientes con brucelosis nos llevó a focalizarnos en la habilidad de las plaquetas para interactuar y/o modular la activación de estas células. En primer lugar, nos propusimos modelar la formación de complejos plaqueta-PMN observada en los pacientes mediante la infección *in vitro* de sangre entera. Para esto, sangre entera proveniente de dadores sanos fue infectada con *B. abortus* y luego marcada con anticuerpos anti-CD14 y anti-CD61. Tal como fue descripto anteriormente, la presencia de complejos plaqueta-PMN ($CD14^{-}CD61^{+}$) fue analizada por citometría de flujo dentro de la región de PMN. Como se puede observar en la Figura 11A-C, *B. abortus* fue capaz de aumentar el porcentaje de neutrófilos asociados a plaquetas (% de células $CD14^{-}CD61^{+}$). Sin embargo, la cantidad de

plaquetas adheridas por neutrófilo (intensidad de CD61 dentro de la región $CD14^{-}CD61^{+}$) permaneció constante (Figura 11D). A continuación, nos preguntamos acerca del tipo de interacciones establecidas entre las plaquetas y los neutrófilos. Para analizar esto, neutrófilos aislados fueron incubados con plaquetas en presencia o ausencia de *B. abortus* (PMN: *Ba*: PLT 1:100:100) por 30 minutos. Luego, los neutrófilos fueron marcados utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD11b (rojo) y las plaquetas con un anti-CD61 (verde) y las muestras fueron analizadas por microscopia confocal. Se pudo observar la interacción directa entre plaquetas y PMN en presencia de *B. abortus* (Figura 11E). Más aun, en este caso pudimos observar la presencia de plaquetas dentro de los PMN (Figura 11E).

De forma global, estos resultados demuestran que la infección por *B. abortus* promueve el establecimiento de complejos plaqueta-PMN. En el contexto de esta infección, los neutrófilos no sólo interactúan con las plaquetas, sino que también son capaces de internalizarlas.

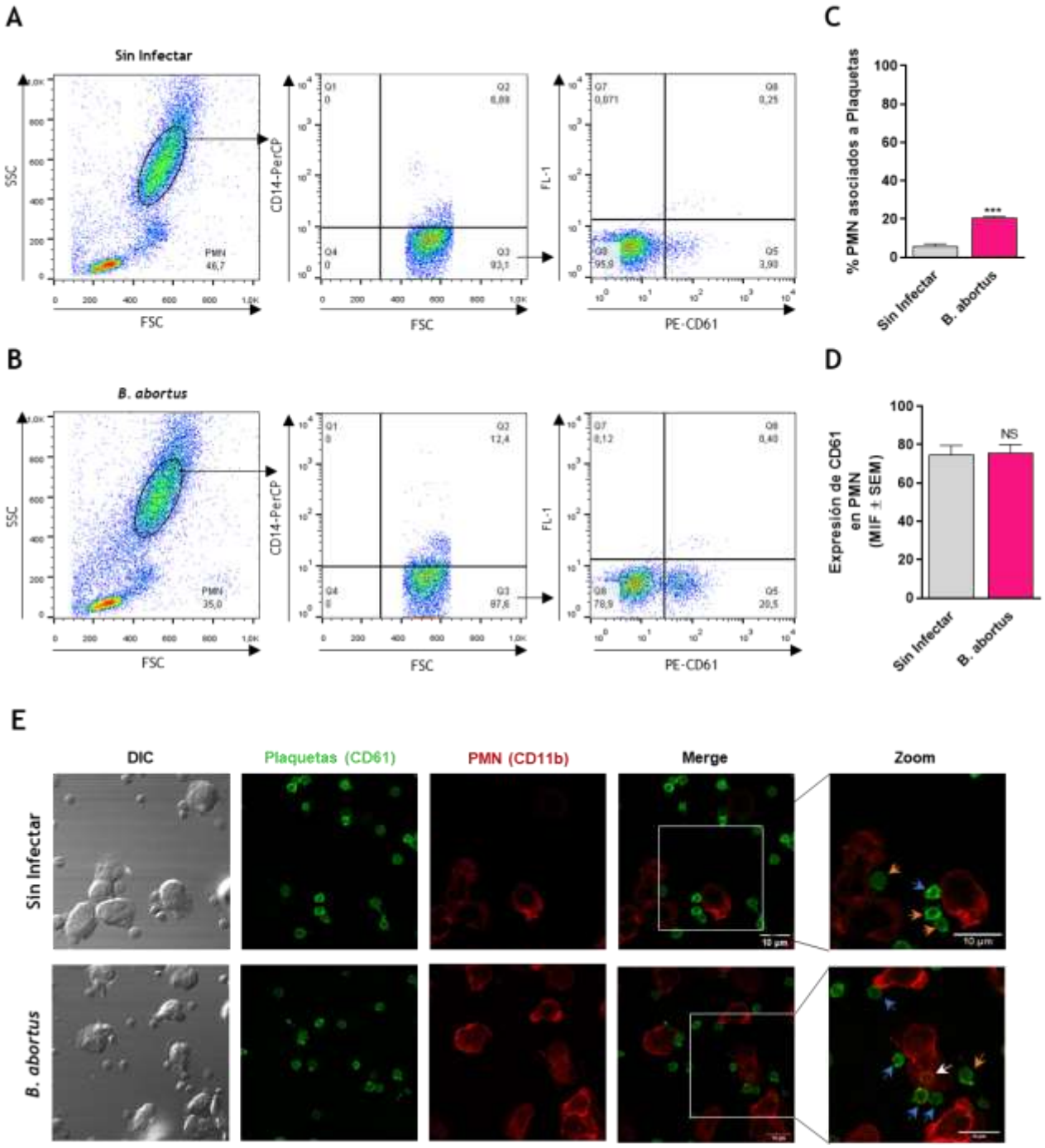


Figura 11. *B. abortus* promueve la formación de complejos plaqueta-PMN en sangre entera. Análisis por citometría de flujo de sangre entera sin infectar **(A)** o infectada *in vitro* con *B. abortus* por 30 min **(B)**. Las muestras de sangre fueron marcadas con anticuerpos anti-CD61PE y anti-CD14PerCP humanos y analizadas por citometría de flujo para identificar complejos plaqueta-PMN. **(C)** Cuantificación de los complejos plaqueta-PMN dentro de la región de PMN. Los datos fueron expresados como porcentaje de PMN asociados a plaquetas ($CD14^{-}CD61^{+}$ dentro de la región de PMN) ± SEM de tres experimentos independientes. **(D)** Expresión de CD61 cuantificada en PMN asociados a plaquetas. Las barras representan la media aritmética ± SEM de tres experimentos independientes. MIF: media de la intensidad de fluorescencia. **(E)** Micrografía confocal de PMN infectados o no con *B. abortus* en presencia de plaquetas por 30 min. Los neutrófilos fueron marcados con un anticuerpo primario anti-CD11b humano, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa-546 (rojo). Las plaquetas fueron marcadas con un anticuerpo primario anti-CD61 humano seguido de

un anticuerpo secundario conjugado a Alexa-488 (verde). Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. La cantidad de células analizadas por grupo experimental fue de 200. Las flechas blancas indican plaquetas internalizadas por neutrófilos. Las flechas azules indican plaquetas asociadas a neutrófilos mientras que las flechas naranjas indican plaquetas libres. PMN: PLT: *Ba* 1:100:100. *** $P<0.001$ *vs.* Sin Infectar; NS: no significativo.

Las plaquetas promueven la activación de PMN inducida por *B. abortus*

Luego de estudiar la interacción entre plaquetas y neutrófilos en el contexto de la infección con *B. abortus*, decidimos evaluar la capacidad de las plaquetas para modular la activación de células PMN. Para esto, neutrófilos aislados fueron infectados con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas. Luego, los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados para la cuantificación de IL-8 por ELISA, y la expresión de CD11b y CD62L (L-Selectina) en la superficie de los PMN fue analizada por citometría de flujo. Tal como fue demostrado anteriormente por nuestro laboratorio[116], la infección con *B. abortus* induce la secreción de IL-8 y la expresión de CD11b mientras que disminuye la de CD62L (Figura 12A-C), respuesta compatible con la activación de PMN. La presencia de plaquetas durante la infección intensificó la secreción de IL-8 y la expresión de CD11b mientras que redujo aún más la expresión de CD62L en la superficie de los neutrófilos (Figura 12A-C). Por otro lado, evaluamos el estallido respiratorio asociado a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), una función asociada a la capacidad bactericida de los fagocitos. Tal como se puede observar en la Figura 12D, la presencia de plaquetas durante la infección favorece la producción de ROS.

En conjunto, estos resultados demuestran que las plaquetas potencian la activación y la función microbicida de los neutrófilos en el contexto de la infección con *B. abortus*.

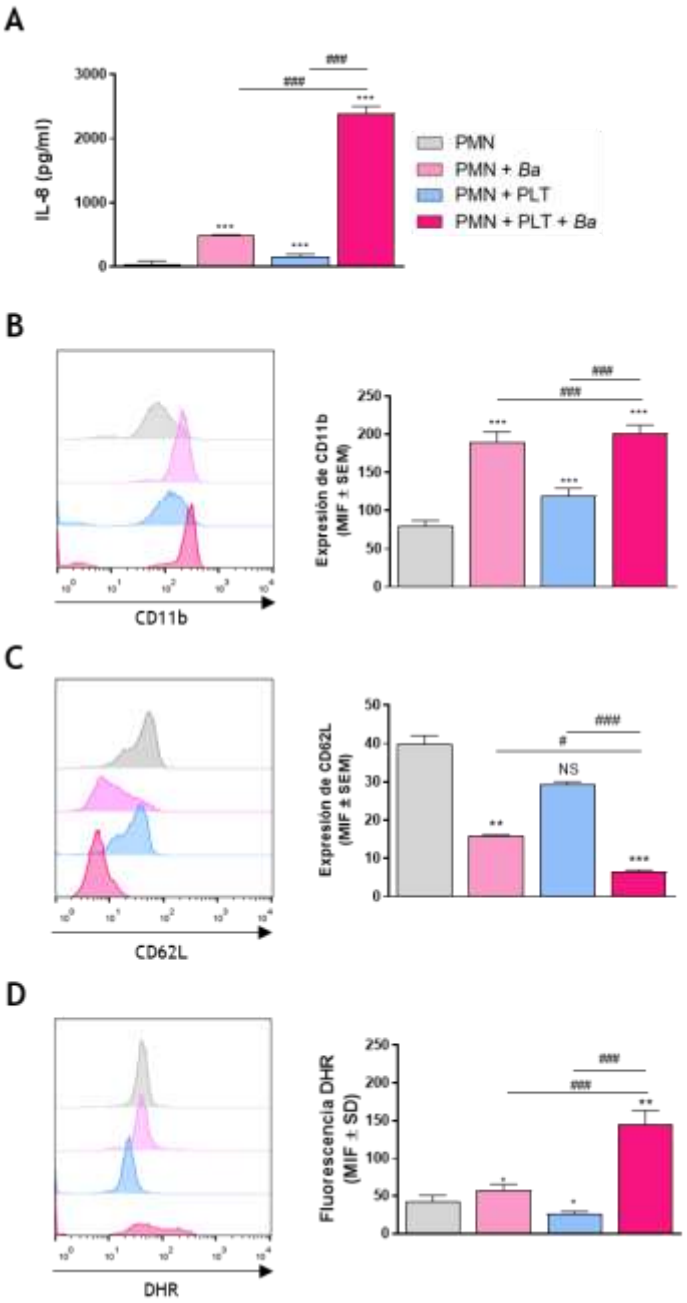


Figura 12. Las plaquetas promueven la activación de PMN inducida por *B. abortus*. Células PMN purificadas fueron infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas por 30 minutos y su estado de activación fue analizado por diversas técnicas. **(A)** El sobrenadante de los PMN fue recolectado y la concentración de IL-8 fue cuantificada por ELISA. La población de células PMN fue identificada en un FSC *vs.* SSC *dot plot*. La expresión de CD11b **(B)**, CD62L **(C)** y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la fluorescencia de 123-dihidrorodamina (DHR) **(D)** fue analizada dentro de la región de PMN por citometría de flujo. Las barras representan la media aritmética ± SD de cinco experimentos independientes.

MIF: media de la intensidad de fluorescencia.

PMN: PLT: *Ba* 1:100:100. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ *vs.* Sin Infectar. $^{\#}$ $P<0.05$. $^{\#\#\#}$ $P<0.001$. NS: No Significativo

La interacción plaqueta-PMN es necesaria para el estallido respiratorio, pero no para la expresión de CD11b en superficie

A continuación, nos preguntamos si la modulación funcional de los neutrófilos en este contexto requería de la interacción física con las plaquetas, o si se encontraba mediada por factores solubles. Para responder este interrogante, neutrófilos aislados fueron estimulados con sobrenadantes obtenidos de plaquetas infectadas con *B. abortus*. Como control, los neutrófilos fueron estimulados con N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) o sobrenadantes obtenidos del cultivo de plaquetas o bacterias solas. Luego, las dimensiones de las células PMN, la expresión de CD11b y la generación de ROS fue analizada por citometría de flujo. El sobrenadante proveniente de plaquetas infectadas fue capaz de inducir tanto el aumento del parámetro FSC de los PMN

(Figura 13A-C) como la expresión de CD11b en superficie (Figura 13D) de manera similar al tratamiento con fMLP (Figura 13A-D). Sin embargo, los sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas con *B. abortus* no fueron capaces de estimular la producción de ROS (Figura 13E).

En resumen, estos resultados indican la presencia de factores solubles liberados por las plaquetas infectadas involucrados en la alteración del FSC y la expresión de CD11b por parte de los neutrófilos. Por lo tanto, la interacción directa entre ambas poblaciones podría resultar dispensable en la modulación de estos parámetros de activación. Sin embargo, el contacto o la interacción física entre plaquetas y PMN es necesario para la modulación del estallido respiratorio.

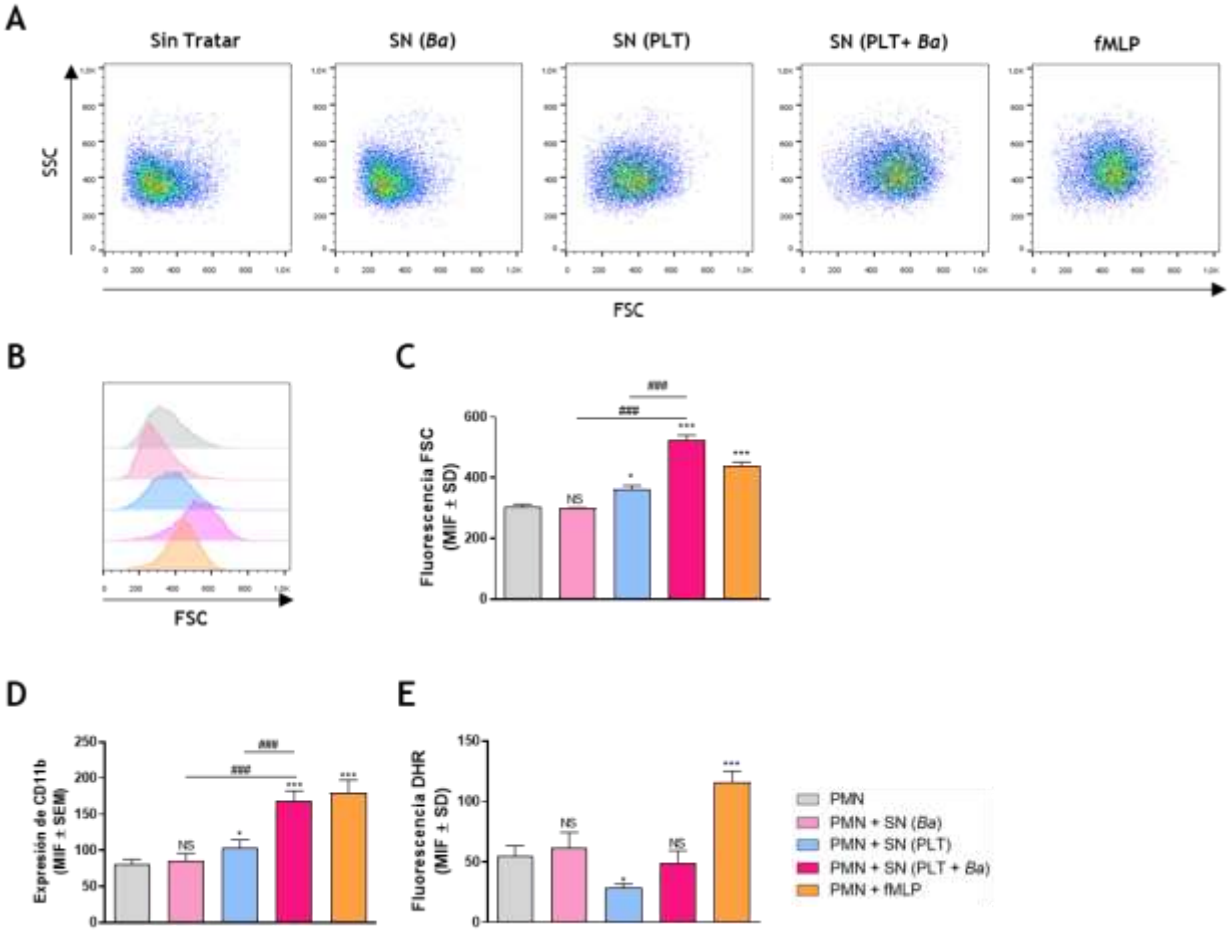


Figura 13. La interacción plaqueta-PMN es necesaria para el estallido respiratorio, pero no para la expresión de CD11b en superficie. Células PMN purificadas fueron tratadas por 30 min con sobrenadantes recolectados de plaquetas infectadas con *B. abortus* y su estado de activación fue analizado por citometría de flujo. La población de células PMN fue identificada en un FSC *vs.* SSC *dot plot*. El aumento del parámetro FSC de los neutrófilos fue analizado **(A y B)** y cuantificado **(C)**. Además, también se analizó la expresión de CD11b **(D)** y la formación de ROS **(E)** dentro de la región. Las barras representan la media aritmética ± SD de cinco experimentos independientes. MIF: media de la intensidad de fluorescencia. PMN: PLT: *Ba* 1:100:100. * $P<0.05$; *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar. $^{###}$ $P<0.001$. NS: no significativo.

Las plaquetas promueven la contención y eliminación de *B. abortus* por parte de los PMN

Finalmente nos preguntamos si la presencia de plaquetas modula el curso de la infección por *B. abortus*. En la literatura han sido descriptos diversos mecanismos intra- y extracelulares por los cuales los neutrófilos pueden modificar la carga bacteriana. En primer lugar, nos concentramos en los mecanismos intracelulares de eliminación de bacterias. Para esto, PMN aislados fueron infectados con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas a diferentes concentraciones por 1 h. Luego, todo el remanente de bacteria extracelular fue eliminado mediante la adición de antibióticos y las células fueron mantenidas en cultivo por 2 o 3 h adicionales. Los PMN fueron finalmente lisados para realizar el recuento de UFC en placa. Con el objetivo de poder discriminar entre las bacterias provenientes del interior de las plaquetas o de los PMN, en paralelo a la infección de PMN en presencia de plaquetas, realizamos el recuento de UFC de plaquetas infectadas con *B. abortus* en ausencia de PMN. El número de bacterias recuperadas de los cultivos de plaquetas solas fueron despreciables con respecto a las recuperadas de PMN y no cambiaron a lo largo del tiempo. No obstante, esta posible contribución fue extraída del recuento final de UFC en todos los tratamientos. Como se puede observar en la Figura 14A, la presencia de plaquetas no modifica la invasión inicial de PMN por parte de *B. abortus*. Sin embargo, la presencia de plaquetas favorece la contención de la infección en periodos de tiempo más prolongados (Figura 14A). Este resultado demuestra que el aumento en el nivel de activación y el estallido respiratorio mediado por las plaquetas promueve el control y la eliminación de *B. abortus* dentro de los PMN infectados.

Por otro lado, nos preguntamos si las plaquetas también pueden modular mecanismos de eliminación extracelulares. Para responder esto, neutrófilos aislados fueron infectados con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas a diferentes concentraciones por 1, 2 o 3 h en medio estándar sin antibióticos. Luego de la incubación, los PMN fueron separados por centrifugación y se realizó el recuento de bacterias extracelulares viables en el sobrenadante libre de células. Como se puede observar en la Figura 14B, los PMN son capaces de disminuir parcialmente la carga extracelular de *B. abortus*. Más aun, la presencia de plaquetas sólo favorece la eliminación extracelular de bacterias a 1 h post-infección (Figura 14B).

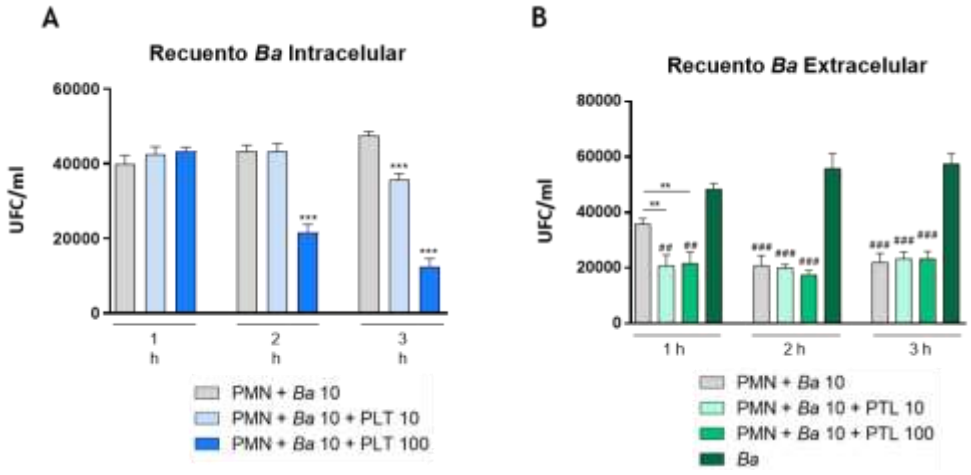


Figura 14. Las plaquetas promueven la contención y eliminación de *B. abortus* por parte de los PMN. (A) Células PMN fueron infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas en diferentes relaciones por 1 h y luego incubadas con antibióticos por 2 o 3 h adicionales. Los PMN fueron finalmente lisados y plaqueados. **(B)** Células PMN fueron infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas en diferentes relaciones por 1, 2 o 3 h. Pasado ese tiempo, el sobrenadante de cada tratamiento fue plaqueado. Los datos fueron expresados como UFC por ml para cada tiempo. Las barras representan la media ± SD de triplicados representativos de un experimento de los tres experimentos independientes realizados. PMN: PLT: *Ba* 1:10:10 o 1:10:100 según se especifica. ** P<0.01; *** P<0.001 *vs.* PMN + *Ba*. $^{\#\#}$ P<0.01; $^{\#\#\#}$ P<0.001 *vs. Ba*.

Tanto para la eliminación intra- como extracelular de bacterias, comprobamos que el efecto observado sobre el recuento de UFC no se debe a una pérdida de la viabilidad de los neutrófilos (Figura 15). En conjunto, estos resultados sugieren que las plaquetas inicialmente favorecen la eliminación extracelular de la bacteria y luego, al favorecer un aumento del nivel de activación y la formación de especies reactivas de oxígeno, promueven la eliminación de la bacteria fagocitada.

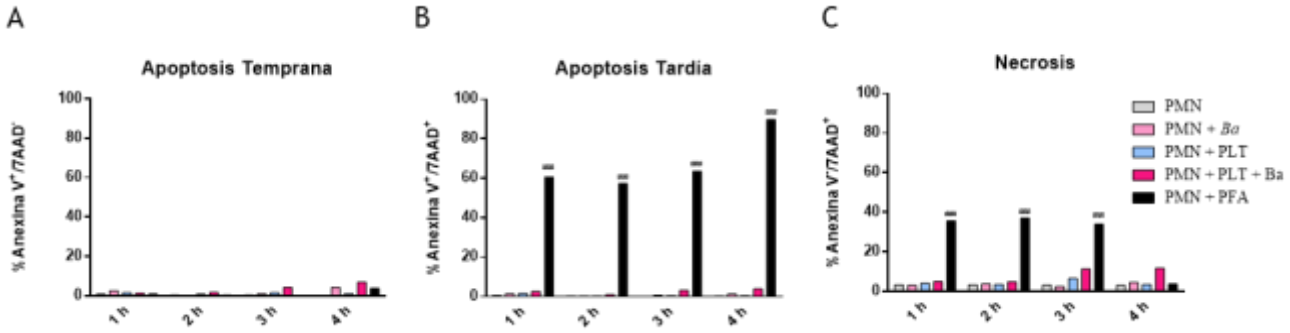


Figura 15. El efecto de las plaquetas sobre el recuento de UFC, no se debe a una pérdida de viabilidad de los PMN. Células PMN fueron infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas por 1, 2, 3 o 4 h. Luego, el porcentaje de células expresando 7AAD y/o Anexina V fue evaluada por citometría de flujo. **(A)** Porcentaje de células en apoptosis temprana, definidas como Anexina $V^+/7AAD^-$. **(B)** Porcentaje de células en apoptosis tardía, definidas como Anexina $V^+/7AAD^+$. **(C)** Porcentaje de células necróticas, definidas como Anexina $V^-/7AAD^+$. Como control positivo de la técnica se utilizaron células tratadas con paraformaldehído (PFA). PMN: PLT: *Ba* 1:100:100. $^{\#\#\#}$ P<0.001 *vs.* Sin Infectar.

Resultados Parte III

Las plaquetas infectadas liberan quimioatractantes de monocitos y neutrófilos

Diversos trabajos han descripto que las plaquetas promueven distintos pasos del proceso de extravasación leucocitaria tanto de monocitos como de neutrófilos en el contexto de una infección. Por lo tanto, el siguiente objetivo de esta tesis fue analizar el rol de las plaquetas en la modulación de la migración de monocitos y neutrófilos.

En primer lugar, evaluamos la capacidad de las plaquetas para reclutar monocitos y neutrófilos al sitio de infección. Para ello, realizamos un clásico ensayo de quimiotaxis en placas de *transwell*, utilizando como estímulo quimioatractante medios condicionados provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus*. Como control, se utilizaron sobrenadantes provenientes de bacterias solas. Células mononucleares obtenidas a partir de sangre periférica o neutrófilos purificados fueron sembrados en el pocillo superior de la placa e incubados durante 3 h. Pasado ese tiempo, se recolectó el medio contenido en el pocillo inferior y se realizó el recuento de células migradas.

Como podemos observar, el sobrenadante proveniente de plaquetas infectadas promueve la quimiotaxis de células mononucleares de sangre periférica y de neutrófilos (Figura 16).

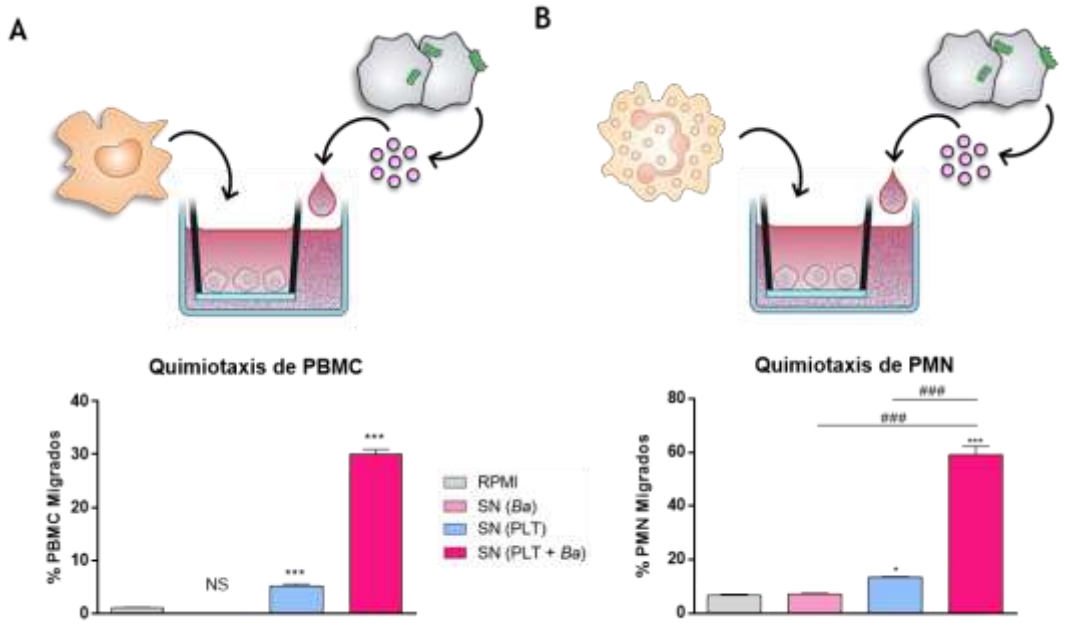


Figura 16. Las plaquetas infectadas liberan quimioatractantes de monocitos y neutrófilos. Células mononucleares obtenidas a partir de sangre periférica (PBMC) **(A)** o neutrófilos purificados **(B)** fueron sembrados en el pocillo superior de una placa de *transwell*. En el pocillo inferior se utilizaron sobrenadantes provenientes de *B. abortus*, Plaquetas o Plaquetas infectadas con *B. abortus* como estímulo quimioatractante. Pasadas 3 h de incubación, el medio contenido en el pocillo inferior fue recolectado y se realizó el recuento de células migradas. La información está expresada como porcentaje de células migradas. Las barras representan la media ± SD de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. * $P<0.05$; *** $P<0.001$ *vs.* RPMI. ### $P<0.001$. NS: no significativo.

Las plaquetas promueven la activación del endotelio mediada por *B. abortus*

El reclutamiento de nuevos leucocitos hacia los sitios de infección requiere que los mismos sean capaces de extravasar hacia los tejidos. Un factor clave en este proceso es la activación del endotelio en los sitios de transmigración.

Teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio que demuestran la capacidad de *B. abortus* para activar al endotelio[154], nos preguntamos si las plaquetas son capaces de modular este fenómeno. Para responder esto, células endoteliales provenientes de cultivo primario de cordón umbilical (HUVEC), y de las líneas celulares HMEC (*Human Mammary Endothelial Cells*) y HBMEC (*Human Brain Microvascular Endothelial Cells*) fueron infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas por 24 h. Como medida de la activación endotelial se utilizó la expresión en membrana de CD54 (ICAM-1), ya que su expresión resulta un paso clave en diferentes pasos de la extravasación leucocitaria[155].

Tal como describimos anteriormente[156], la infección con *B. abortus* induce una leve activación del endotelio en los tres modelos celulares utilizados. Sin embargo, la presencia de plaquetas durante la infección aumenta significativamente el estado de activación del endotelio, cuantificada como el aumento de la expresión de CD54, en los tres modelos analizados (Figura 17).

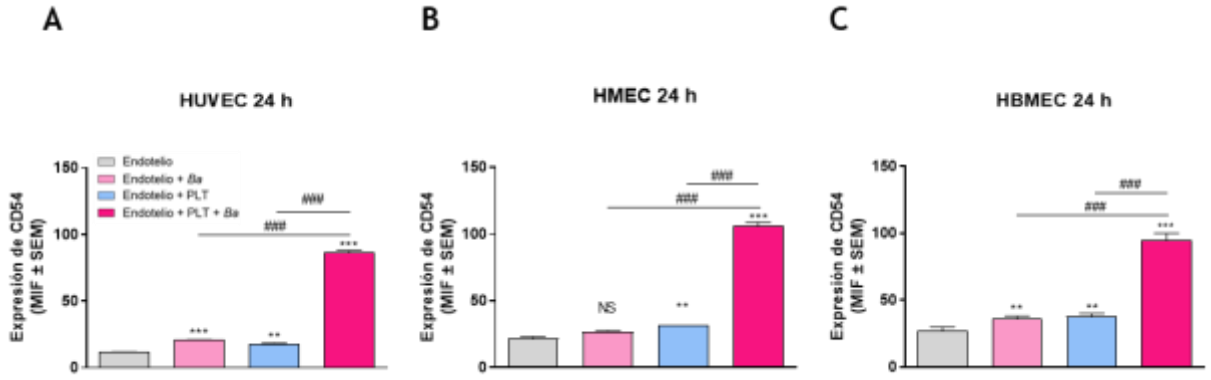


Figura 17. Las plaquetas promueven la activación del endotelio mediada por la infección con *B. abortus*. Células endoteliales provenientes de cultivo primario (HUVEC) **(A)**, y de las líneas celulares HMEC **(B)** y HBMEC **(C)** fueron infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas por 24 h. El estado de activación de las tres poblaciones fue analizado mediante la expresión de CD54 en superficie. MIF: media de la intensidad de fluorescencia. Las barras representan la media ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. Endotelio: PLT: *Ba* 1:100:100. ** $P<0.005$; *** $P<0.001$ *vs.* Sin Infectar. ### $P<0.001$. NS: no significativo

Con el objetivo de investigar los mecanismos involucrados en esta modulación, y dilucidar si requería del contacto físico entre las células endoteliales y las plaquetas infectadas, recurrimos nuevamente a un ensayo de medio condicionados. En este caso, células endoteliales de los tres modelos fueron estimuladas durante 24 h con sobrenadantes provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus*. Como control, se utilizaron células endoteliales tratadas con sobrenadantes provenientes de bacterias solas. Finalmente, la activación endotelial fue cuantificada como expresión de CD54 en superficie (Figura 18). Como podemos

observar, los sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas fueron capaces de activar los tres tipos de células endoteliales demostrando la presencia de factores solubles involucrados en este fenómeno (Figura 18).

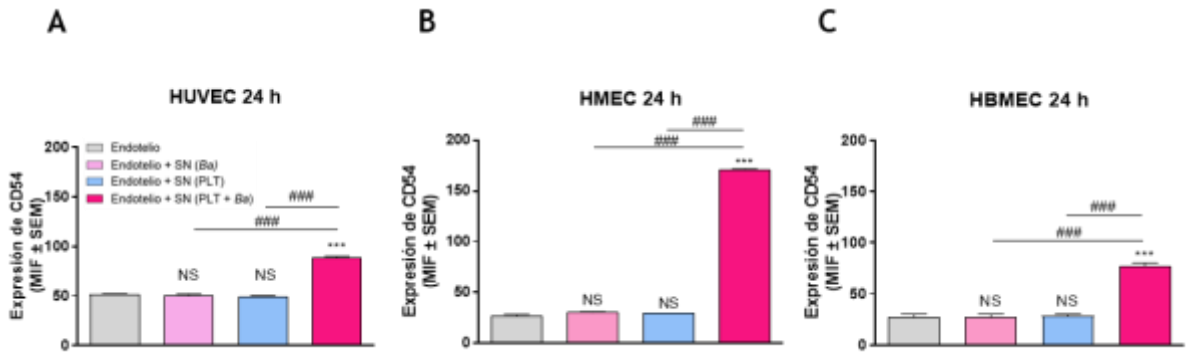


Figura 18. Sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas promueven la activación del endotelio. Células endoteliales provenientes de cultivo primario (HUVEC) **(A)**, y de las líneas celulares HMEC **(B)** y HBMEC **(C)** fueron tratadas con sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas con *B. abortus* por 4 h y luego mantenidas en medio fresco por 20 h adicionales. Luego, el estado de activación de las tres poblaciones fue analizado mediante la expresión de CD54 en superficie. MIF: media de la intensidad de fluorescencia. Las barras representan la media ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar. ### $P<0.001$. NS: no significativo.

Factores secretados por las plaquetas infectadas activan células HBMEC

Como mencionamos en la introducción, las bacterias del género *Brucella* pueden producir diferentes desordenes inflamatorios[3]. La presentación con mayor morbilidad es la neurobrucelosis, un trastorno inflamatorio neurodegenerativo causado por la invasión del sistema nervioso central. Teniendo en cuenta la importancia de la funcionalidad endotelial de la barrera hematoencefálica en el mantenimiento de la homeostasis del sistema nervioso central, a continuación, profundizamos el estudio sobre la activación de células HBMEC inducida por sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas.

La expresión de CD40 en la superficie endotelial ha sido implicada en diferentes condiciones patológicas como puede ser la enfermedad de Alzheimer y la encefalitis inducida por el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1). En estos casos, la expresión de CD40 presenta un papel clave en la disrupción de la barrera hematoencefálica, asociada a la fisiopatología de la enfermedad[157]. Además de la expresión de CD54, el fenotipo activado inducido por el sobrenadante de plaquetas infectadas incluye un aumento significativo de la expresión de CD40 (Figura 19B) y de la secreción de IL-6, MCP-1 e IL-8 (Figura 19C-E) en comparación a HBMEC no estimuladas. Más aun, los niveles de activación alcanzados por la estimulación con sobrenadantes de plaquetas infectadas son comparables con aquellos alcanzados con sobrenadantes de astrocitos infectados[156] o IL-1β, utilizados como control positivo.

Estos resultados demuestran que las plaquetas infectadas inducen un estado activado en células endoteliales de la microvasculatura cerebral, caracterizada por la expresión de moléculas de adhesión y la secreción tanto de citoquinas como quemoquinas proinflamatorias (Figura 19).

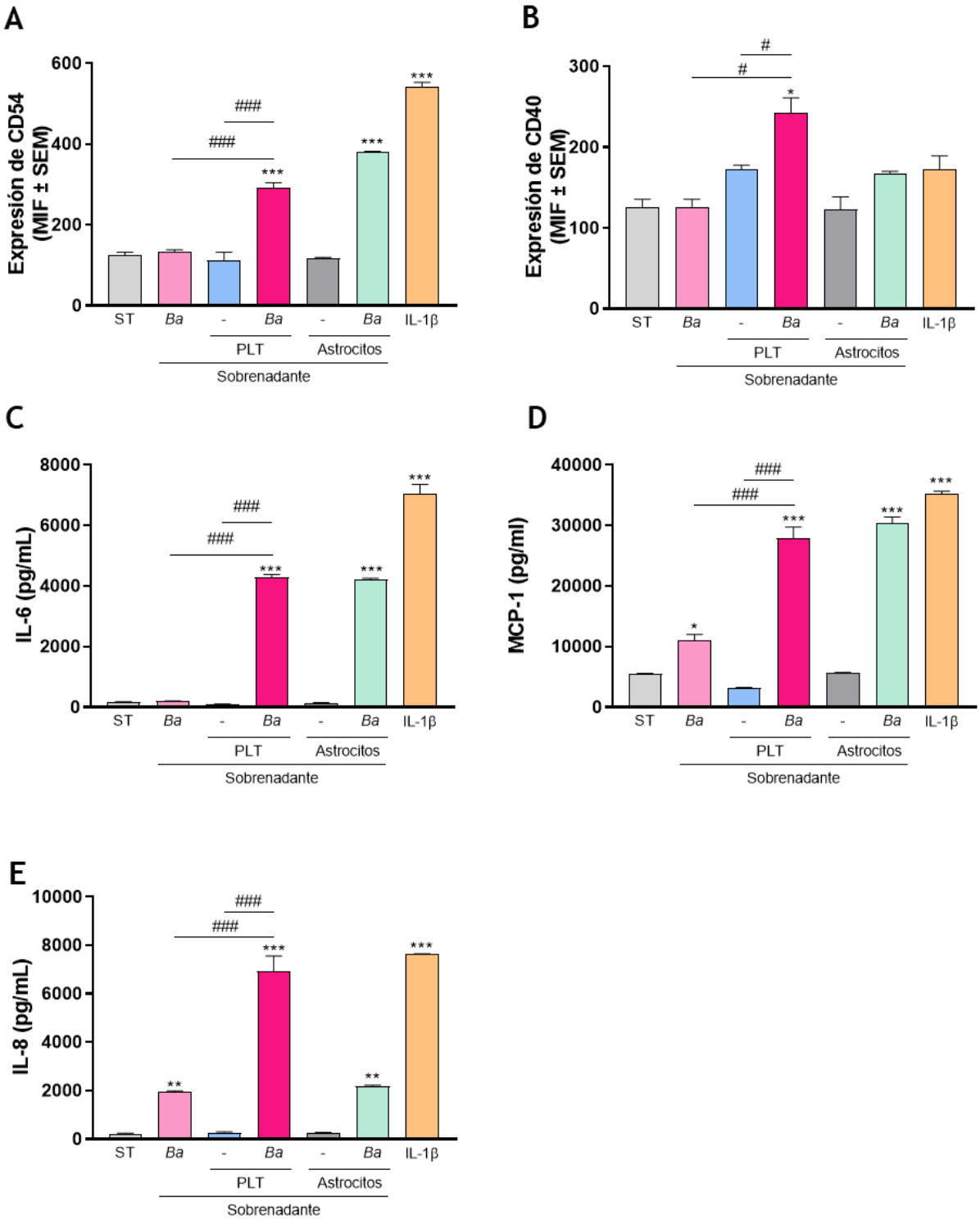


Figura 19. Sobrenadantes de plaquetas infectadas inducen el fenotipo activado de células endoteliales de la microvasculatura cerebral. Células endoteliales HBMEC fueron tratadas con sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas con *B. abortus* por 4 h y luego mantenidas en medio fresco por 20 h adicionales. Como control se utilizaron sobrenadantes provenientes de astrocitos infectados o sin infectar e IL-1β recombinante. Luego, el estado de activación de las tres poblaciones fue analizado mediante la expresión de CD54 **(A)** y CD40 **(B)** en superficie. Además, se recolectaron los sobrenadantes para la cuantificación de IL-6 **(C)**, MCP-1 **(D)** e IL-8 **(E)** por ELISA. Las barras representan la media ±

SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. * $P<0.05$; ** $P<0.005$; *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar. $^{\#}$ $P<0.05$; $^{\#\#\#}$ $P<0.001$. NS: no significativo.

Diversos trabajos han demostrado que las bacterias del género *Brucella* liberan vesículas denominadas "*outer-membrane vesicles*" (OMV por sus siglas en inglés, también conocidas como *Blebs*) que contienen lipopolisacárido (LPS), proteínas de la membrana externa y otros componentes bacterianos[158]. Para descartar la posibilidad de que los OMV estén involucrados en la activación endotelial de la microvasculatura cerebral, los sobrenadantes de cultivo fueron ultracentrifugados tal como fue descripto previamente[158]. Luego, las células HBMEC fueron incubadas con los sobrenadantes ultracentrifugados por 24 h y se evaluó su estado de activación. No se encontraron diferencias significativas en la activación inducida por los sobrenadantes depletados y no-depletados de OMVs (Figura 20). Para descartar un posible efecto de factores liberados por *B. abortus*, la bacteria fue incubada sola en las mismas condiciones de cultivo por 24 h y luego se recolectó el sobrenadante para su ultracentrifugación. Estos sobrenadantes de *B. abortus* "libres de plaquetas" fueron utilizados como control y no fueron capaces de inducir activación de las HBMEC (Figura 20). En conjunto, estos resultados indican que la activación de las HBMEC depende de factores solubles liberados exclusivamente por las plaquetas infectadas.

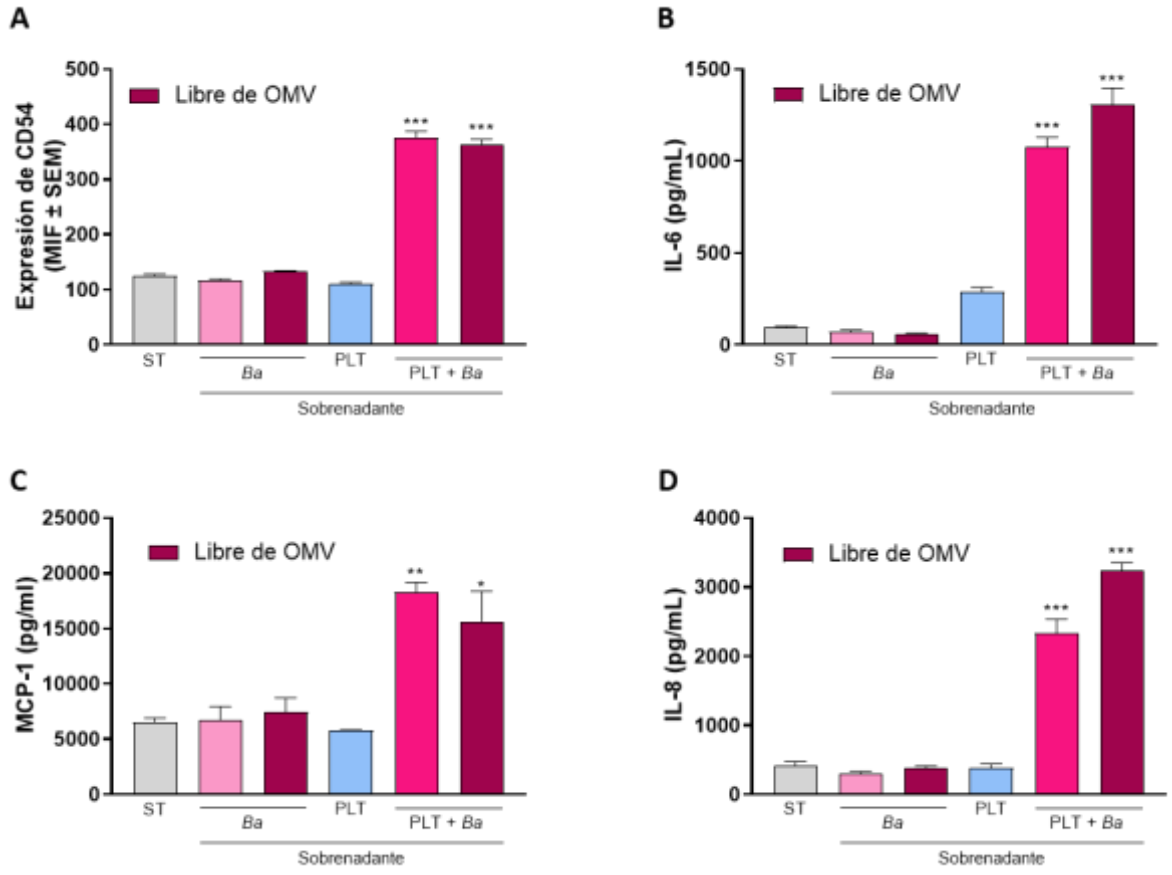


Figura 20. La activación de HBMEC depende de factores liberados por las plaquetas infectadas. Sobrenadantes recolectados del cultivo de plaquetas infectadas (PLT + *Ba*) o bacteria sola fueron ultracentrifugados (sobrenadantes libres de OMV). Luego, los sobrenadantes fueron utilizados para estimular células HBMEC por 24 h

adicionales y el estado de activación de las tres poblaciones fue analizado mediante la expresión de CD54 **(A)** en superficie. Además, se recolectaron los sobrenadantes para la cuantificación de IL-6 **(B)**, MCP-1 **(C)** e IL-8 **(D)** por ELISA. Las barras representan la media ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. * $P<0.05$; ** $P<0.005$; *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar.

Las plaquetas infectadas promueven la transmigración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica

La presencia de leucocitos en el líquido cefalorraquídeo y el parénquima cerebral ha sido previamente descripta como parte de la patogenia de la neurobrucelosis[159]. Este fenómeno, conocido habitualmente como pleocitosis, podría explicarse por una activación anormal de la barrera hematoencefálica inducida por la presencia de *Brucella*.

En primer lugar, analizamos si la activación del endotelio cerebral inducida por los sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas era suficiente para promover la migración de monocitos y neutrófilos. Para ello, utilizamos un modelo previamente descripto de transmigración a través de la barrera hematoencefálica *in vitro*[156]. Brevemente, este modelo consiste en el sembrado de células de la línea HBMEC en el pocillo superior de las placas de *transwell* y su cultivo hasta confluencia. Una vez establecidas, las monocapas fueron estimuladas por 24 h con sobrenadantes provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus*. El sobrenadante de bacterias solas fue utilizado como control. A continuación, células mononucleares de sangre periférica o neutrófilos purificados fueron sembrados en el pocillo superior e incubados por 3 h. Finalmente, se recolectó el medio contenido en el pocillo inferior y se realizó el recuento de las células migradas (Figura 21).

Nuestros resultados indican que el tratamiento del endotelio con el sobrenadante de plaquetas infectadas es suficiente para inducir la transmigración tanto de células mononucleares (Figura 21B) como de neutrófilos (Figura 21C) a través de la barrera.

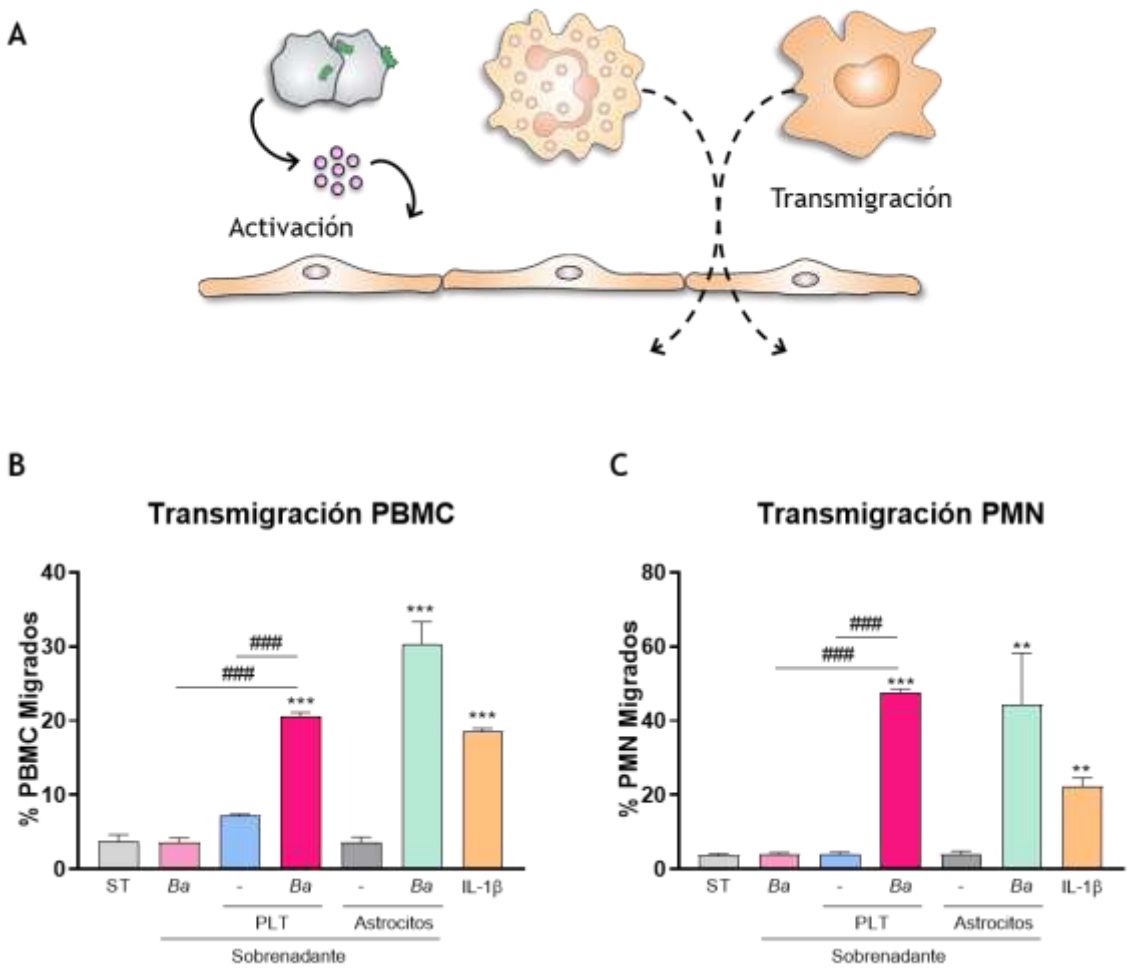


Figura 21. Células HBMEC activadas por plaquetas infectadas con *B. abortus* permiten la transmigración de monocitos y neutrófilos a través de la barrera hematoencefálica. Monocapas de células de la línea HBMEC establecidas en el pocillo superior de las placas de *transwell,* fueron estimuladas por 24 h con sobrenadantes provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus*. Como control se utilizaron sobrenadantes provenientes de astrocitos infectados o sin infectar e IL-1β recombinante. Luego, células mononucleares de sangre periférica o neutrófilos purificados fueron sembrados en el pocillo superior e incubados por 3 h **(A)**. Finalmente, se recolectó el medio contenido en el pocillo inferior y se realizó el recuento de las células mononucleares **(B)** o PMN **(C)** migradas. Las barras representan el porcentaje de células migradas ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar. ### $P<0.001$. NS: no significativo.

La vía de señalización de Erk1/2 se encuentra involucrada en la transmigración a través de la barrera hematoencefálica

A continuación, decidimos estudiar el mecanismo molecular involucrado en la activación endotelial y la transmigración celular. Teniendo en cuenta que previamente ha sido demostrada la importancia de la vía de señalización de Erk 1/2 en la activación de células endoteliales de la vasculatura cerebral[160], decidimos

investigar su relevancia en nuestro contexto. Para ello, células HBMEC fueron pretratadas con un inhibidor especifico de la vía Erk1/2, denominado PD98059. Seguidamente, las células fueron estimuladas por 24 h con sobrenadantes provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus*. Como podemos observar, la inhibición farmacológica de Erk1/2 reduce parcialmente la expresión de CD54 inducida por el sobrenadante de plaquetas infectadas (Figura 22A). Más aun, la secreción de citoquinas y quemoquinas por parte de las células HBMEC activadas también se encuentra regulada por esta vía ya que su inhibición con PD98059 disminuye parcialmente la secreción de IL-6, MCP-1 e IL-8 (Figura 22B-D).

El aumento de la expresión de la molécula de adhesión CD54 en la superficie de las células endoteliales es uno de los pasos claves de la migración ya que permite el *rolling* de los leucocitos circulantes sobre el endotelio activado. Dada la importancia fisiológica de este paso, nos preguntamos si la inhibición de la vía de Erk1/2 es suficiente para impedir la transmigración de células a través de la barrera inducida por las plaquetas infectadas. Para esto, nuevamente se realizaron ensayos de *transwell* utilizando el modelo de barrera hematoencefálica previamente descripto. En este caso, la monocapa de células HBMEC fue pretratada con el inhibidor comercial de Erk1/2 (PD98059). Luego, las células HBMEC fueron estimuladas por 24 h con los sobrenadantes provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus* y se realizó el ensayo de transmigración de neutrófilos tal como fue descripto. Nuestros resultados demuestran que la vía de señalización de Erk1/2 no sólo está involucrada en el aumento de la expresión de CD54 en la superficie de las células endoteliales, sino que es necesaria para la correcta transmigración de neutrófilos a través de la barrera hematoencefálica. (Figura 22E).

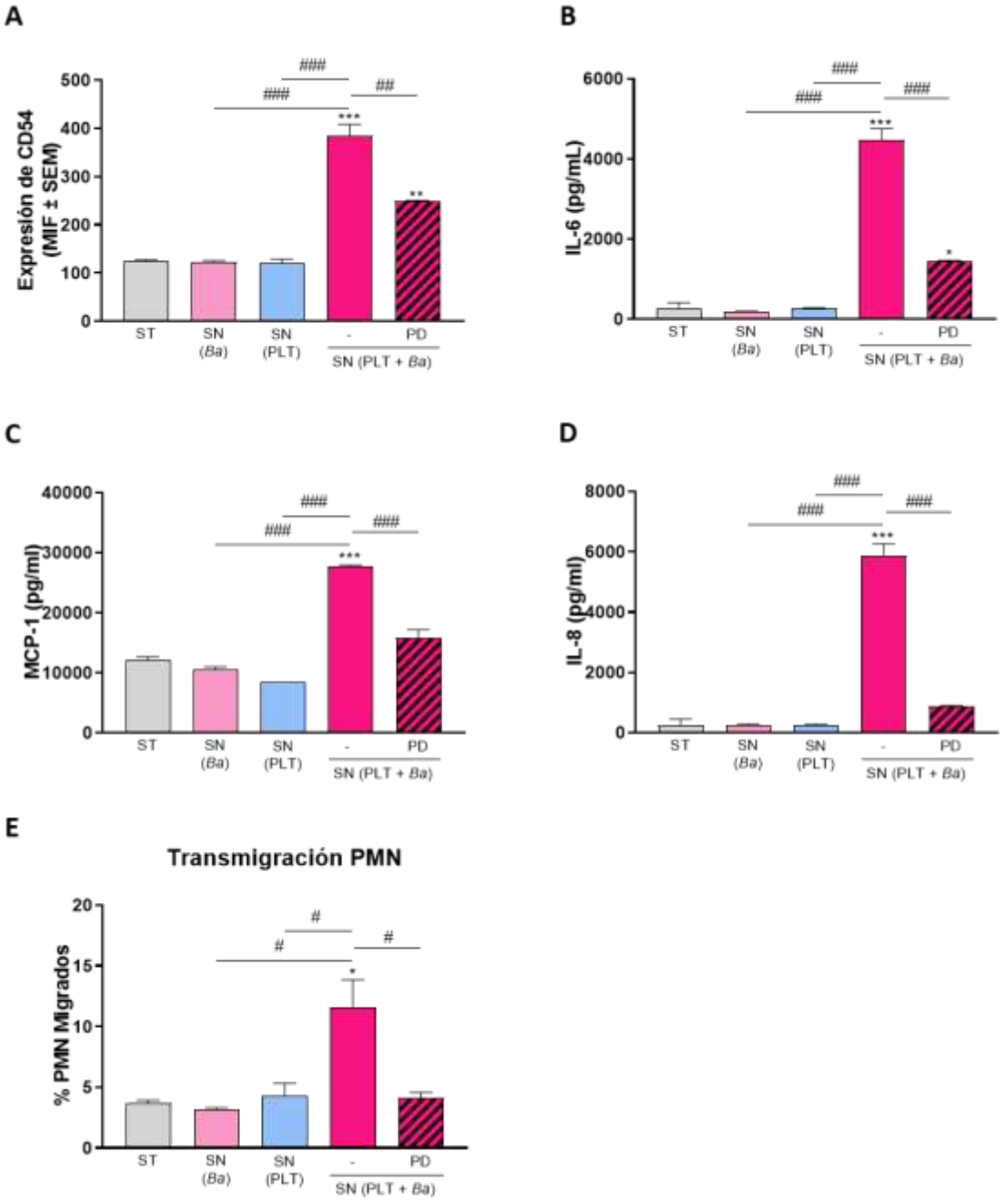


Figura 22. La vía de señalización de Erk1/2 se encuentra involucrada en la transmigración a través de la barrera hematoencefálica. Células HBMEC fueron pretratadas con PD98059 por 2 h. Luego, las células fueron estimuladas por 24 h con sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas con *B. abortus*. Como control, se utilizaron los sobrenadantes provenientes de *B. abortus* y plaquetas incubadas solas. **(A)** La activación de las células endoteliales fue cuantificada mediante la expresión de CD54 en superficie. MIF: media de la intensidad de fluorescencia. Además, se recolectaron los sobrenadantes de las HBMEC y la presencia de IL-6 **(B)**, MCP-1 **(C)** e IL-8 **(D)** fue cuantificada por ELISA. Las barras representan la media ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. * $P<0.05$; ** $P<0.005$; *** $P<0.001$ *vs.* RPMI. $^{\#}$ $P<0.05$; $^{\#\#}$ $P<0.005$; $^{\#\#\#}$ $P<0.001$.

La presencia de plaquetas favorece la migración de células mononucleares infectadas a través del endotelio

Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que *B. abortus* es capaz de acceder al compartimento cerebral dentro de monocitos/macrófagos infectados, mecanismo usualmente conocido como Caballo de Troya. De esta manera, los monocitos infectados funcionan como fuente *de novo* para la infección de células de la glía[161]. Teniendo en cuenta que la activación de células de la glía resulta un paso crucial en la patogenia de la neurobrucelosis[162], finalmente nos preguntamos si la presencia de plaquetas favorece la transmigración directa de monocitos infectados. Para ello, nuevamente utilizamos el modelo de transmigración a través de la barrera hematoencefálica. En este caso, las monocapas fueron mantenidas en medio fresco y células mononucleares de sangre periférica fueron sembradas en el pocillo superior del *transwell* en presencia de plaquetas y/o bacteria e incubadas por 4 h. Finalmente, se recolectó el medio contenido en el pocillo inferior y se realizó el recuento de las células migradas (Figura 23A). Como control, se realizó un experimento de transmigración a través del endotelio activado, tal como describimos para la figura 21. Nuestros resultados indican que la presencia de *B. abortus* o plaquetas es suficiente para inducir la migración de monocitos a través del endotelio (Figura 23B). Sin embargo, la presencia de plaquetas durante la infección aumenta significativamente el porcentaje de monocitos migrados. De esta manera, la presencia de plaquetas durante la infección favorecería el ingreso de monocitos infectados al sistema nervioso central, permitiendo la infección de células de la glía y empeorando los signos inflamatorios de la neurobrucelosis.

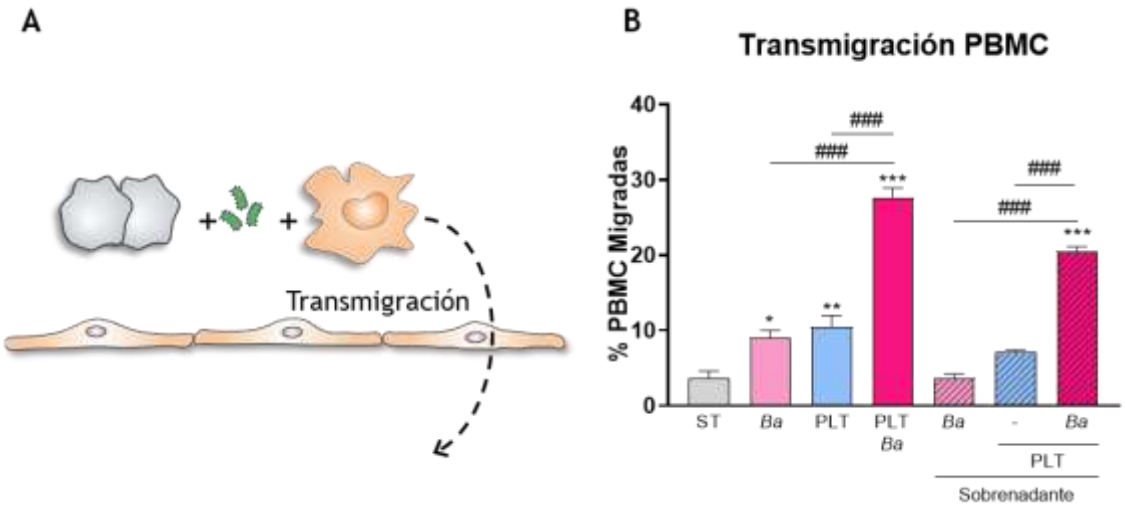
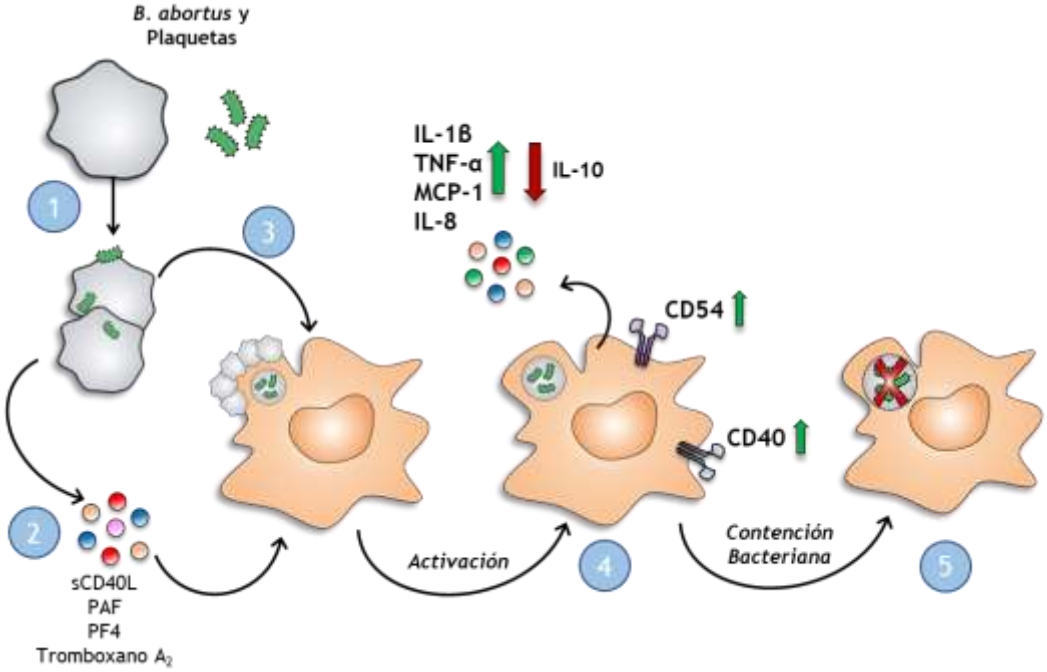


Figura 23. La presencia de plaquetas promueve la migración de monocitos infectados. Monocapas de células de la línea HBMEC fueron establecidas en el pocillo superior de las placas de *transwell*. Luego, células mononucleares de sangre periférica fueron sembradas en el pocillo superior en presencia de plaquetas y/o *B. abortus* e incubadas por 4 h (A). Finalmente, se recolectó el medio contenido en el pocillo inferior y se realizó el recuento de las células mononucleares **(B)** migradas. Como control se utilizaron monocapas de HBMEC pretratadas con sobrenadantes provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus* y células mononucleares sin infectar. Las barras representan el porcentaje

de células migradas ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. * $P<0.05$; ** $P<0.005$; *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar. ### $P<0.001$. NS: no significativo.

Discusión de Resultados Parte I

En la primera parte de esta Tesis nos abocamos a dilucidar el rol de las plaquetas en la respuesta mediada por monocitos/macrófagos frente a la infección por *B. abortus*. En particular, nuestros resultados demuestran que las plaquetas interaccionan directamente con *B. abortus* y pueden comportarse como *carriers* de esta bacteria, promoviendo la invasión de monocitos/macrófagos. Como consecuencia de esta función *carrier*, las plaquetas permanecen asociadas y establecen complejos con los monocitos infectados. Esta interacción directa plaqueta-monocito, junto con la liberación de factores solubles plaquetarios, promueve la respuesta proinflamatoria de los monocitos infectados (Modelo 1).



Modelo 1. Las plaquetas son capaces de reconocer la presencia de *B. abortus* **(1)** y activarse, liberando diversos factores solubles como CD40L soluble, PAF, PF4 y Tromboxano A_2 **(2)**. Además, las plaquetas funcionan como *carrier* de las bacterias hacia los monocitos, favoreciendo su infección y formando complejos con los monocitos infectados **(3)**. En conjunto, las plaquetas favorecen la activación de los monocitos hacia un perfil proinflamatorio, aumentando la secreción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión y coestimulatorias, **(4)** que promueve la contención bacteriana dentro de los monocitos infectados **(5)**.

La importancia de los monocitos/macrófagos ha sido ampliamente descripta a lo largo de los años en el contexto de la infección con *B. abortus*. Durante las primeras etapas de la infección, los macrófagos presentan una significativa capacidad microbicida, contribuyendo a la contención de la infección. Sin embargo, también ha sido demostrado que constituyen el principal nicho replicativo de *B. abortus*, permitiendo la persistencia de la bacteria en el hospedador[13,105]. En nuestro laboratorio previamente demostramos que la presencia de plaquetas promueve la invasión de monocitos/macrófagos por parte de *B. abortus*. Adicionalmente, corroboramos que la co-incubación de las tres poblaciones lleva a la formación de complejos entre plaquetas y monocitos. Más aun, describimos la disposición particular que adoptan las plaquetas en estos complejos, rodeando completamente a

los monocitos infectados dando lugar a rosetas tal como las que han sido previamente descriptas en la literatura[163].

Nuestros experimentos de interacción entre *B. abortus* y plaquetas demuestran que ambas poblaciones son capaces de establecer una íntima asociación. De hecho, esta interacción resulta suficiente para desencadenar el proceso de activación plaquetaria. En línea con nuestros resultados, la activación plaquetaria gatillada por el reconocimiento de bacterias también ha sido descripta en otras infecciones. Por ejemplo, ha sido demostrado que el reconocimiento a través de receptores tipo TLR, receptores de complemento, FcγRII y/o diversas moléculas de adhesión presentes en la superficie plaquetaria funciona como mecanismo disparador de la activación plaquetaria en infecciones mediadas por *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus epidermidis* o *Chlamydia pneumoniae*[149].

Interesantemente, nuestros resultados indican que la bacteria no sólo es capaz de unirse a las plaquetas, sino también de invadirlas. Estos resultados concuerdan con diversos estudios que demuestran la habilidad de las plaquetas activadas para internalizar bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Porphyromonas gingivalis*[78,79,96,164]. Estos estudios sugieren que la internalización podría tener consecuencias en el destino de la bacteria y de la infección, ya sea protegiendo a la bacteria del reconocimiento del sistema inmune o promoviendo la lisis bacteriana dentro del citoplasma de las plaquetas[78,79,96,164]. Si bien aún no ha sido demostrada la presencia de fagolisosomas en las plaquetas, se ha observado que las plaquetas pueden fagocitar activamente bacterias como *S. aureus* y secretar moléculas microbicidas como la β-defensina. En consecuencia, se promueve la formación de complejos plaqueta-PMN y la liberación de NETs que podrían ayudar en la inmovilización y eliminación de la bacteria[72].

Por otro lado, nuestros resultados sobre la formación de complejos mixtos entre plaquetas y monocitos infectados nos llevaron a analizar los posibles mecanismos involucrados en este fenómeno. Basándonos en nuestros experimentos de microscopía confocal, demostramos que las plaquetas forman complejos únicamente con los monocitos infectados por *B. abortus*. Más aun, en este trabajo de tesis comprobamos que es el reconocimiento de *B. abortus* por parte de las plaquetas lo que gatilla el proceso de activación plaquetaria y promueve el transporte de la bacteria hacia los monocitos. De esta manera, el establecimiento de los complejos plaqueta-monocito resulta una consecuencia de la activación plaquetaria y su funcionalidad como *carrier*. En línea con estos resultados, otros estudios *in vitro* han demostrado que la activación plaquetaria, en lugar de la activación de monocitos, es responsable de la formación de estos complejos mixtos[165]. Más aun, ha sido demostrado que la interacción directa entre P-selectina y el Ligando de P-Selectina (PSGL-1) expresado en la membrana del monocito es la principal vía involucrada en la formación de complejos plaqueta-monocito[87,95]. Teniendo en cuenta la gran predisposición a la cronicidad que presenta esta infección, el hecho de que un patógeno intracelular como *B. abortus* invada una población celular de vida media tan corta como las plaquetas podría resultar curioso. Sin embargo, en conjunto nuestros resultados apoyan la posibilidad de que la internalización de la bacteria por parte de las plaquetas funcione como mecanismo de evasión del sistema inmune. De esta manera, *B. abortus* podría permanecer protegida dentro de las plaquetas hasta alcanzar su nicho replicativo por excelencia, el monocito/macrófago.

Una vez entendido el mecanismo de establecimiento de estos complejos plaqueta-monocito, nos focalizamos en abordar las consecuencias funcionales de dicha interacción en el contexto de la infección con *B. abortus*. Nuestros resultados demuestran que la presencia de plaquetas durante la infección aumenta la expresión en superficie de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), también conocida como CD54. Estos resultados, junto con resultados previos de nuestro laboratorio que muestran un aumento en la secreción de MCP-1[166], sugieren la presencia de un posible mecanismo de retroalimentación positiva, el cual promueve el reclutamiento y la adhesión de monocitos circulantes al endotelio activado en los focos de infección.

Existen muchos trabajos en la literatura describiendo la asociación entre las vías de señalización de P-selectina y GPIIb/IIIa y las vías de señalización intracelular activadas durante el *crosstalk* entre plaquetas y leucocitos. Sin embargo, Li *et al*. ha propuesto que el *crosstalk* entre plaquetas y monocitos estaría mediado principalmente por la liberación de factores solubles, en lugar de la interacción célula-célula[165]. En línea con esta hipótesis, nuestros resultados demuestran que las plaquetas infectadas con *B. abortus* son capaces de modular la funcionalidad de monocitos, al menos en parte, mediante la liberación de diversos factores solubles. En particular, pudimos confirmar que la secreción coordinada de sCD40L, PF4, PAF y Tromboxano A_2 por parte de las plaquetas infectadas regula la expresión de CD54 en monocitos.

Previamente ha sido propuesto que la interacción del sCD40L proveniente de plaquetas con el receptor CD40 en la superficie de los monocitos modula el estado de activación de los mismos. En particular, se ha demostrado que esta interacción estimula la secreción de citoquinas y la actividad tumoricida de los monocitos, sin la necesidad de un estímulo adicional[167]. Corroborando la importancia de la interacción sCD40L-CD40, resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que las plaquetas también son capaces de aumentar la expresión de CD40 en la superficie de monocitos[166] (Modelo 1).

Por otro lado, recientemente ha sido demostrado que el PF4 y el Tromboxano A_2, ambos factores liberados por las plaquetas, están involucrados en la formación de NETs[168]. Más aun, PF4 previene la apoptosis espontanea de monocitos humanos e induce la diferenciación de los monocitos en una subpoblación específica de macrófagos (58). Adicionalmente, PF4 resulta un potente activador de la fagocitosis y promueve el estallido respiratorio de monocitos y macrófagos tanto humanos como murinos[169].

Con respecto a PAF, ha sido demostrado que la activación del receptor de PAF (PAFR) promueve la fagocitosis y se encuentra involucrado en el *uptake* de *B. abortus* por parte de los monocitos[170]. Resulta importante destacar que en dicho estudio los autores únicamente utilizaron PAF recombinante para estimular a los monocitos, sin tener en cuenta la fuente de dicha molécula o el rol de las plaquetas en la infección. A la luz de nuestros experimentos, podríamos especular que el aumento en la invasión observado en presencia de las plaquetas se debe a la liberación de PAF por parte de las plaquetas activadas y su reconocimiento por PAFR en la superficie de monocitos.

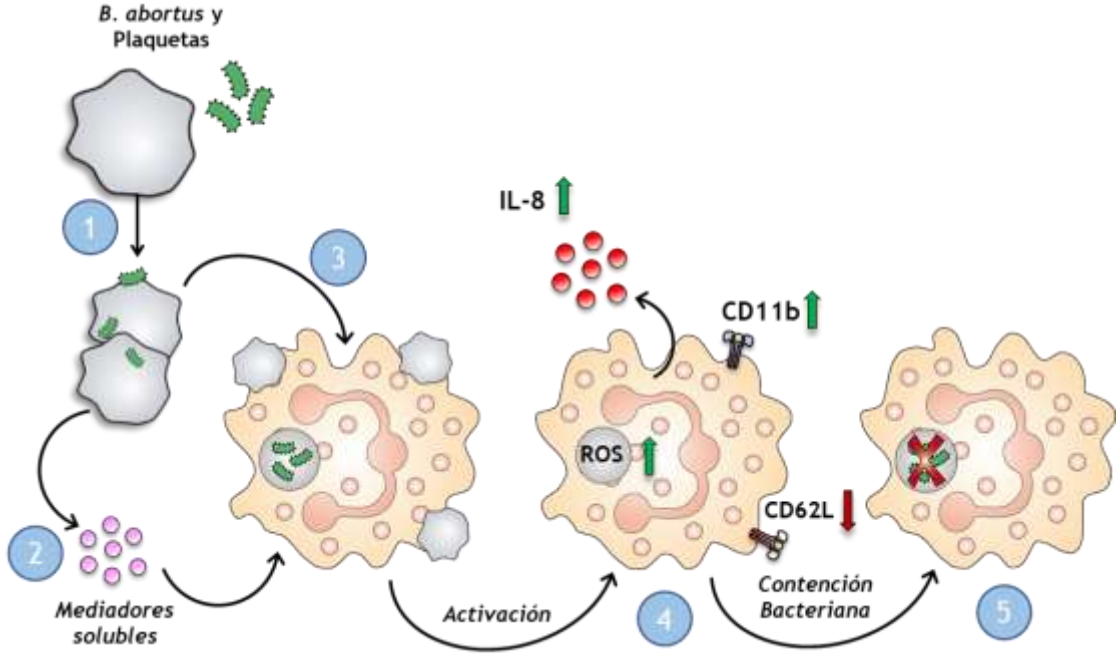
Los resultados obtenidos a partir de nuestros ensayos de recuento intracelular indican que la presencia de plaquetas aumenta la invasión de monocitos por parte de *B. abortus* a tiempos tempranos. Más aun, las plaquetas potencian la secreción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos infectados. Este microambiente, junto con la interacción directa dentro de los complejos plaqueta-monocito

induciría la diferenciación de los monocitos hacia perfiles más proinflamatorios, aumentando su capacidad microbicida. De esta manera, nuestros resultados sugieren un rol protector de las plaquetas, promoviendo inicialmente el *uptake* de la bacteria por parte de los monocitos y la posterior contención dentro de los mismos.

Por último, retomando nuestros resultados previos de la formación de complejos entre plaquetas y monocitos infectados, comprobamos que estos complejos plaqueta-monocito podían establecerse en sangre periférica. Más aun, demostramos que pacientes con brucelosis crónica presentan niveles de complejos plaqueta-monocito elevados en circulación. En línea con estos resultados, ha sido descripto que estos complejos usualmente se encuentran elevados en pacientes con enfermedades asociadas a la inflamación crónica, como es el caso del HIV[77,153]. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que la presencia de complejos plaqueta-monocito en la circulación sanguínea de pacientes con brucelosis podría funcionar como indicativo diagnóstico de un estado inflamatorio.

Discusión de Resultados Parte II

En la segunda parte de esta Tesis, nos abocamos a dilucidar el rol de las plaquetas en la respuesta de los PMN frente a la infección por *B. abortus*. En particular, nuestros resultados demuestran que la infección con *B. abortus* aumenta el porcentaje de complejos plaqueta-PMN en circulación. Más aun, demostramos que las plaquetas promueven la activación de PMN inducida por *B. abortus*, aumentando la contención y la eliminación de la bacteria dentro de los PMN infectados (Modelo 2).



Modelo 2. Las plaquetas son capaces de reconocer la presencia de *B. abortus* **(1)** y activarse, liberando diversos factores solubles **(2)**. En presencia de *B. abortus*, las plaquetas se asocian con los neutrófilos, **(3)** favoreciendo la secreción de IL-8, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), la expresión en superficie de CD11b y la disminución de CD62L **(4).** En conjunto, las plaquetas favorecen los mecanismos extra- e intracelulares de eliminación bacteriana, permitiendo la contención de la infección **(5)**.

Extendiendo los resultados obtenidos en la primera parte de la tesis, demostramos que los pacientes con brucelosis no sólo tienen niveles elevados de complejos plaqueta-monocito, sino que también presentan levemente elevados los niveles de complejos plaqueta-PMN. Previamente ha sido descripto que las personas sanas presentan bajos porcentajes de complejos plaqueta-PMN en circulación[171,172]. Sin embargo, y en línea con nuestros resultados, ese porcentaje se encuentra elevado en patologías de diversa etiología, como infecciones, inflamación estéril, autoinmunidad y metástasis de diversos tipos de cáncer[173–176].

En la primera parte de este trabajo, demostramos que la disposición de las plaquetas en los complejos plaqueta-monocito era muy particular dado que las plaquetas rodeaban completamente a los monocitos formando rosetas[166]. Este descubrimiento nos condujo a profundizar el análisis de la disposición de las plaquetas dentro de los complejos plaqueta-PMN. Nuestros resultados de microscopía confocal demuestran que las plaquetas son capaces de unirse directamente a los neutrófilos, pero no los rodean formando rosetas. Estos resultados van de la mano con otros trabajos publicados en la literatura que demuestran la presencia de

complejos plaqueta-PMN en otras patologías inflamatorias, con una disposición similar a la mostrada en este trabajo[176,177].

Sorprendentemente, nuestra aproximación experimental nos permitió observar algunas plaquetas internalizadas por los PMN. Teniendo en cuenta que ya demostramos que *B. abortus* interacciona de forma directa con las plaquetas y las invade, podríamos hipotetizar que la internalización de plaquetas infectadas por parte de los PMN aumentaría la invasión de PMN por *B. abortus*. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la presencia de plaquetas no modifica la invasión inicial de PMN por *B. abortus*. Si bien algunos trabajos publicados demuestran cierta resistencia de *B. abortus* a la acción microbicida de los neutrófilos[111,178], nuestros resultados demuestran que la presencia de plaquetas promueve la contención extracelular de la carga bacteriana a tiempos cortos, y la contención intracelular de la infección en tiempos más prolongados. En línea con estos resultados, ha sido previamente demostrado que las plaquetas pueden favorecer la fagocitosis de diversas bacterias por parte de los PMN[179,180] así como la formación de NETs[181,182]. Adicionalmente, las plaquetas pueden promover la liberación de ROS y mieloperoxidasa (MPO) favoreciendo la contención tanto extra- como intracelularmente[183].

En este trabajo también demostramos que las plaquetas promueven la activación de los PMN en el contexto de la infección con *B. abortus*, evidenciada por un aumento en la secreción de IL-8, la inducción de CD11b y la disminución de CD62L en superficie. Además, las plaquetas favorecen la actividad microbicida de los PMN, tal como fue demostrado por un aumento del estallido respiratorio. En línea con estos resultados, ha sido probado que la interacción directa con plaquetas aumenta la activación de neutrófilos, cuantificada como expresión de CD11b[184,185]. Más aun, estudios realizados *in vivo* muestran que el establecimiento de complejos plaqueta-PMN, mediados principalmente por la interacción entre P-Selectina y PSGL-1[186–189], es un paso clave para el reclutamiento de neutrófilos al tejido inflamado. Adicionalmente, estudios *in vitro* demostraron que las plaquetas son capaces de realizar el *priming* de los neutrófilos, aumentando la afinidad de las integrinas y la respuesta adhesiva a quemoquinas[190]. Por otro lado, las plaquetas son capaces de tapizar el endotelio durante la inflamación, lo cual funcionaría como puente entre los neutrófilos previamente activados por las plaquetas, y las células endoteliales[191]. La interacción mediada por P-Selectina ha sido identificada como el paso clave para la activación mutua entre leucocitos y células endoteliales[126,175,192]. De acuerdo con estas evidencias, nuestros resultados demuestran un aumento en la secreción de IL-8, sugiriendo un ciclo de retroalimentación positiva, el cual favorecería el reclutamiento y la adhesión de PMN circulantes al endotelio activado en el sitio de infección.

Como mencionamos anteriormente, si bien tanto P-Selectina como GPIIb/IIIa se encuentran normalmente asociados a las vías de señalización activadas durante el *crosstalk* entre plaquetas y leucocitos, Li *et al*. han sugerido que este *crosstalk* estaría mediado principalmente por factores solubles[84]. Por ejemplo, ha sido probado que PAF induce el *priming* de PMN y el aumento de la expresión de CD11b[193,194] en superficie, mientras que PF4 (CXCL4) induce la activación de PMN mediante su reconocimiento por CD11b[195]. De manera similar, nuestros experimentos realizados con medios condicionados indican la presencia de factores solubles liberados por las plaquetas infectadas involucrados en la modulación del FSC y la expresión de CD11b. Sin embargo, el contacto directo célula-célula es necesario para la modulación del estallido respiratorio. Este

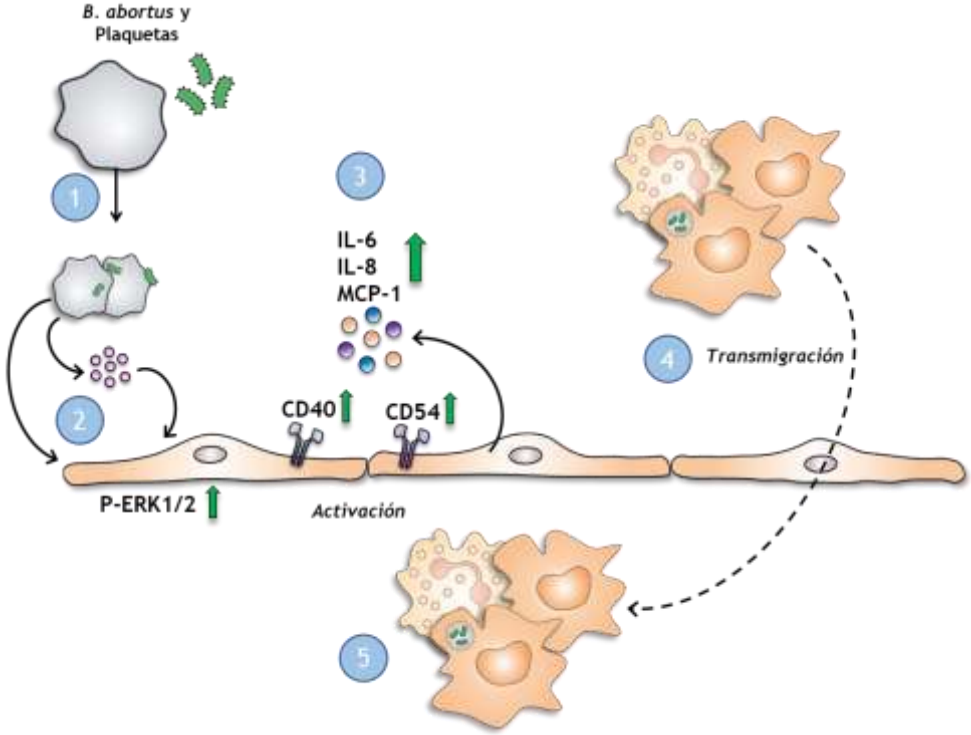
resultado podría ser explicado teniendo en cuenta que las plaquetas expresan de manera constitutiva el ligando de TREM-1, el cual induce la activación de los PMN, la fagocitosis y la producción de ROS al ser reconocido por su receptor[196]. Específicamente, ha sido demostrado que las plaquetas tienen una gran capacidad de aumentar el estallido respiratorio inducido por LPS, obteniendo resultados similares a los obtenidos por inducción directa de los PMN con un anticuerpo agonista especifico de TREM-1[197–199]. En ese trabajo, Haselmayer *et al*. demostraron que la activación de TREM-1 es necesaria para la iniciación del estallido respiratorio. Sin embargo, la formación de complejos plaqueta-PMN se encuentra estabilizada por otras interacciones, ya que el establecimiento de estos complejos no pudo ser bloqueado utilizando anticuerpos anti-TREM-1 o ligando de TREM-1 soluble[199]. Más aun, estos autores corroboraron la importancia de la interacción entre P-Selectina y PSGL-1 en el establecimiento de los complejos plaqueta-PMN[199], tal como había sido previamente descripto en la literatura[186–189].

Algunos de los resultados obtenidos a partir de estudios realizados *in vitro* con neutrófilos aislados han sido controversiales acerca de la capacidad de contener a *B. abortus*[106,111,113,114,116,200]. Nosotros, en cambio, tuvimos en consideración la presencia de otras poblaciones celulares relevantes en el contexto de las infecciones. En particular, demostramos que la presencia de plaquetas aumenta la capacidad microbicida de los PMN, mejorando la contención de la infección tanto dentro de los PMN como en el medio extracelular. Más aun, nuestros experimentos de recuento bacteriano sugieren una diferencia temporal en la modulación ejercida por las plaquetas sobre las actividades microbicidas del PMN. Eso se debe a que las plaquetas favorecerían los mecanismos de eliminación extracelular dentro de la primera hora post-infección mientras que parecen aumentar los mecanismos intracelulares en tiempos más prolongados.

.

Discusión de Resultados Parte III

En la tercera parte de esta Tesis, nos abocamos a dilucidar el rol de las plaquetas en la migración de monocitos y neutrófilos en respuesta a la infección por *B. abortus*. En conjunto, nuestros resultados demuestran que las plaquetas infectadas tienen la capacidad de reclutar monocitos y neutrófilos al sitio de infección mediante la liberación de quimioatractantes solubles. Así mismo, estas plaquetas infectadas promueven la activación del endotelio, fomentando la secreción tanto de quemoquinas y citoquinas proinflamatorias como la expresión de moléculas de adhesión. En conjunto, estos mecanismos favorecen la extravasación de monocitos y neutrófilos (Modelo 3).



Modelo 3. Las plaquetas son capaces de reconocer la presencia de *B. abortus* **(1)** y activarse, liberando factores solubles **(2)** que inducen la activación de células HBMEC **(3)**. Esta activación, caracterizada por la secreción de IL-6, IL-8 y MCP-1 y el aumento de CD40 y CD54 en superficie, promueve la transmigración de monocitos y neutrófilos a través de la barrera endotelial **(4)**. De esta manera, los monocitos y neutrófilos infectados que atraviesan la barrera podrían funcionar como fuente de infección para células gliales, empeorando los signos inflamatorios de la neurobrucelosis **(5)**.

En la literatura ha sido descripta una amplia variedad de moléculas liberadas por plaquetas que presentan actividad quimioatractante sobre PMN y monocitos, entre las que podemos destacar la β-tromboglobulina (CXCL7), PF4 (CXCL4), RANTES (CCL5) y el Leucotrieno B4[201–204]. De esta manera, en primer lugar, nos preguntamos si las plaquetas infectadas con *B. abortus* son capaces de reclutar monocitos y/o PMN hacia el sitio de infección. Nuestros resultados indican que el sobrenadante de plaquetas infectadas induce la quimiotaxis tanto de monocitos como de neutrófilos hacia el sitio de infección. Este resultado se encuentra íntimamente relacionado con la capacidad de las plaquetas para aumentar las propiedades adhesivas tanto de los monocitos/macrófagos como de los PMN, mencionadas en las secciones anteriores[88–93].

En condiciones fisiológicas, las células endoteliales presentes en la vasculatura de tejidos no inflamados tienen como funciones principales el mantenimiento de la fluidez sanguínea y el control de la permeabilidad vascular[29,31,205,206]. En estas condiciones, las células endoteliales en reposo no interaccionan con los leucocitos circulantes ya que las proteínas de interacción necesarias se encuentran principalmente retenidas en el interior celular[31–33]. Sin embargo, frente a un estímulo inflamatorio como puede ser la infección con *B. abortus*[207], el endotelio vascular se activa rápidamente movilizando estas moléculas de adhesión hacia la membrana extracelular[208]. En línea con estas observaciones, nuestros resultados demuestran que, si bien la infección con *B. abortus* induce una leve activación de los tres tipos de endotelios analizados, la presencia de plaquetas durante la infección aumenta significativamente el estado de activación de los mismos. El aumento en la expresión de CD54 y CD40 en las células endoteliales remarca la función de las plaquetas como amplificadoras de la inflamación endotelial[209]. De acuerdo con estos resultados, otros autores han demostrado que la interacción con plaquetas activadas induce significativamente la expresión de CD62E (E-Selectina), CD106 (VCAM-1) y CD54 (ICAM-1) en la superficie de células HUVEC, aun en ausencia de otros estímulos inflamatorios[210].

La integridad de la barrera hematoencefálica es esencial para la protección del sistema nervioso central frente a posibles patógenos y/o toxinas sistémicas. La disfuncionalidad endotelial o la activación del endotelio en esta barrera es responsable de la patogénesis de una variedad de patologías del sistema nervioso central[42], incluyendo muchas de origen infeccioso[152,156,211]. Resultados previos de nuestro laboratorio indican la capacidad de *B. abortus* para inducir la inflamación del parénquima cerebral, a través de la activación de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica[156]. En este trabajo, profundizamos el estudio del fenómeno y demostramos que la presencia de plaquetas durante la infección con *B. abortus* potencia el estado de activación de las células HBMEC. Concomitantemente, demostramos que esta modulación es independiente del contacto directo entre plaquetas y células endoteliales. Además del aumento de las moléculas de adhesión, las plaquetas activadas inducen la secreción de IL-6, IL-8 y MCP-1 por parte de las células HBMEC. Estos resultados correlacionan con la capacidad de otras infecciones bacterianas de activar plaquetas circulantes y dañar células endoteliales reportada en la literatura[71,212]. A su vez, trabajos realizados *in vivo* han demostrado que las plaquetas son uno de los primeros componentes celulares arrestados en el endotelio inflamado[213] promoviendo su activación y permitiendo el posterior arresto de otros leucocitos circulantes. En paralelo, diversos trabajos han descripto la presencia de micropartículas derivadas de plaquetas que favorecerían el reclutamiento de nuevos leucocitos al foco de infección[214–216].

Resultados recientes de nuestro laboratorio revelaron el mecanismo fisiopatológico utilizado por *B. abortus* para atravesar la barrera hematoencefálica. Estos estudios demostraron que *B. abortus* es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica por si sola, a pesar de su capacidad de invadir y replicar en células endoteliales de la microvasculatura cerebral. Sin embargo, *B. abortus* es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (demostrado a partir de un modelo *in vitro*) dentro de lo monocitos infectados, mecanismo conocido como Caballo de Troya[161]. En línea con estos resultados, en este trabajo demostramos que la activación del endotelio por parte de las plaquetas infectadas favorece la transmigración tanto de monocitos como PMN en el modelo *in vitro*. Más aún, la presencia de plaquetas promueve el proceso de transmigración de células

mononucleares a través del endotelio. Como mencionamos anteriormente, ha sido previamente descripto que las plaquetas se asocian a las células endoteliales en la cara luminal, permitiendo el reclutamiento de monocitos a las regiones de transmigración o "*hot spots*" a través de la interacción de CD40, CD40L y L-Selectina[213]. Al mismo tiempo, ha sido descripto que factores solubles liberados por las plaquetas también pueden controlar la extravasación de leucocitos en pasos posteriores a la transmigración a través del endotelio activado[190,202,217].

Trabajos realizados *in vivo* en modelos de alergia y de inflamación pulmonar no-alérgica, han demostrado que la presencia de plaquetas es absolutamente necesaria para el reclutamiento de neutrófilos hacia los tejidos inflamados[213,218,219], dado que la depleción de plaquetas resulta en la abolición casi completa de la adherencia y transmigración vascular tanto de neutrófilos como de monocitos en vénulas de bajo calibre[213]. De esta manera, en nuestro contexto, los monocitos y/o PMN infectados con *B. abortus* podrían funcionar como fuente de bacteria para la infección *de novo* de otros tipos celulares dentro del parénquima cerebral, como son la microglía y los astrocitos[161]. Recíprocamente, también hemos demostrado que células de la glía infectadas con *B. abortus* liberan una serie de mediadores inflamatorios[156]. Estos mediadores favorecen la entrada de nuevas células infectadas desde la circulación periférica, aumentando la infección y la consecuente disfunción de la barrera a través de un círculo vicioso patogénico. La capacidad de las plaquetas infectadas para aumentar la transmigración de monocitos y neutrófilos demostrada en esta tesis empeoraría esta situación, agravando las consecuencias y/o morbilidades de la neurobrucelosis.

La vía de las MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) ha sido asociada con diversos procesos biológicos como la activación y diferenciación celular, proliferación celular, y apoptosis[220]. En particular, la vía de Erk1/2 se encuentra involucrada en la activación de las células HBMEC[160] y en la permeabilidad endotelial[221]. Nuestros experimentos de inhibición farmacológica determinaron que la vía de Erk1/2 efectivamente está involucrada en la activación de células HBMEC inducida por sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas. En este caso, demostramos que esta vía se encuentra implicada en la expresión de CD54 en superficie, necesaria para la transmigración de neutrófilos. Los inhibidores farmacológicos de MAPK, tales como el imidazol, han sido previamente identificados como drogas antiinflamatorias útiles para patologías infamatorias del SNC[222]. De esta manera, nuestros resultados sugieren la posibilidad de inhibir la activación de la vía de Erk1/2 como estrategia terapéutica en casos graves de neurobrucelosis, restringiendo de este modo el deterioro de la barrera hematoencefálica y reduciendo potencialmente la morbilidad de la patología.

En conjunto, los resultados presentados en este capítulo describen los mecanismos implicados en la activación endotelial mediada por plaquetas infectadas con *B. abortus*. En particular, centramos nuestros estudios en la activación de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, estudiando cómo las plaquetas promueven el cruce de monocitos y neutrófilos a través de la barrera hematoencefálica. Esto mecanismos podrían contribuir a un aumento en la infección de las células gliales, produciendo y estimulando la respuesta inflamatoria ejecutada por la activación de las células gliales, empeorando de esta manera el cuadro de neurobrucelosis y la respuesta inflamatoria desencadenada por la activación glial (Modelo 3).

Conclusiones Finales

En este trabajo abordamos el estudio del rol de las plaquetas como encargadas de la modulación de la respuesta inmune innata frente a *Brucella abortus*. En la primera parte del trabajo, nos centramos en el estudio de la población de monocitos/macrófagos y entre las **conclusiones** de esta parte podemos destacar que:

- Las plaquetas son capaces de detectar la presencia de *B. abortus* y activarse frente al reconocimiento.
- Las plaquetas funcionan como *carriers* de la bacteria hacia los monocitos, favoreciendo su infección y dando lugar a complejos plaqueta-monocito.
- La presencia de plaquetas, ya sea por interacción directa o mediante la liberación de factores solubles, induce la activación de monocitos hacia un perfil proinflamatorio. De esta manera, si bien favorecen su invasión inicial, las plaquetas promueven la contención bacteriana dentro de los monocitos infectados.
- Los pacientes con brucelosis crónica presentan niveles elevados de complejos plaqueta-monocito en circulación.

A continuación, nos focalizamos en la modulación de las células polimorfonucleares o neutrófilos, destacándose las siguientes **conclusiones**:

- Los pacientes con brucelosis crónica también presentan niveles elevados de complejos plaqueta-PMN en circulación.
- La presencia de plaquetas, también promueve la activación de los PMN hacia un perfil proinflamatorio y sus funciones microbicidas.
- En este caso, la modulación de CD11b y del tamaño celular es mediada por factores solubles liberados por las plaquetas. Por el contrario, la modulación del estallido respiratorio requiere de la interacción directa entre PMN y plaquetas.
- La presencia de plaquetas promueve la eliminación extracelular de *B. abortus* a tiempos tempranos, y la contención intracelular dentro de los PMN infectados a tiempos más tardíos.

Por último, nos centramos en la capacidad de las plaquetas para modular la migración y extravasación tanto de neutrófilos como de monocitos, y la modulación de la activación del endotelio. Las principales **conclusiones** de esta sección son las siguientes:

- Las plaquetas liberan quimioatractantes que atraen tanto a neutrófilos como a monocitos.
- Las plaquetas promueven la activación del endotelio, tanto mediante la liberación de factores solubles como a través de la interacción directa con células endoteliales.
- La activación de la barrera hematoencefálica por factores secretados por plaquetas infectadas promueve la transmigración de monocitos y neutrófilos *in vitro*.

- El aumento de la transmigración de células a través de la barrera hematoencefálica mediada por las plaquetas depende de la activación de la vía de señalización de ERK1/2.

Teniendo en cuenta todos nuestros resultados hasta el momento, hemos ampliado significativamente la visión del rol de las plaquetas en el contexto de la infección con *B. abortus*. Las plaquetas participan al activarse frente a la infección e interaccionar directamente tanto con monocitos como con neutrófilos, estableciendo complejos. Estas interacciones promueven la diferenciación de ambas poblaciones celulares hacia perfiles más proinflamatorios con un mayor potencial microbicida, contribuyendo a la resolución de la infección. En este contexto, las plaquetas podrían reducir la carga bacteriana en circulación, fomentando el *uptake* y la restricción de *B. abortus* dentro de los monocitos y los PMN. Sin embargo, *Brucella* es capaz de evadir los mecanismos tempranos de defensa, estableciendo una infección crónica. De hecho, ha sido previamente descripto que los pacientes con brucelosis crónica usualmente presentan trombocitopenia, la cual se encuentra normalmente asociada a una mayor severidad de la patología[223,224]. Si bien las causas que podrían explicar el descenso del recuento plaquetario son variadas, nuestros resultados sugieren que la formación de complejos plaqueta-monocitos y plaqueta-PMN podría contribuir, al menos en parte, a disminuir la cantidad de plaquetas libres en circulación. Esta hipótesis y otros mecanismos y factores posiblemente involucrados aún requieren ser explorados.

Por otro lado, nuestros resultados demuestran que las plaquetas no sólo modulan la activación y funcionalidad de monocitos y PMN, sino también de células endoteliales. En particular, nos centramos en el estudio de la microvasculatura cerebral, donde demostramos que las plaquetas median un aumento de la activación del endotelio en sitios clave de transmigración, favoreciendo el reclutamiento de nuevos leucocitos y la posterior migración de los mismos a través del endotelio. Nuestros resultados sugieren que las plaquetas podrían favorecer la infección de células gliales, iniciando la respuesta inflamatoria característica de la neurobrucelosis.

En conjunto, nuestros resultados demuestran la importancia de las plaquetas durante el desarrollo de la brucelosis y resaltan la relevancia de las mismas como contribuyentes a la respuesta del hospedador frente a la infección por *B. abortus*. Históricamente ha habido grandes controversias acerca del papel de las plaquetas durante las infecciones ya que pueden jugar un rol beneficioso o perjudicial, dependiendo del patógeno involucrado en la infección. Pero, ¿cuál es el rol de las plaquetas en el desarrollo de la brucelosis humana? Nuestros resultados sugieren que, en las etapas tempranas de la patología, las plaquetas favorecerían la contención bacteriana por parte del sistema inmune innato. Más aun, la modulación de la actividad endotelial asociada a la interacción con plaquetas podría favorecer la extravasación de leucocitos, necesaria para la posterior contención y/o erradicación de la infección. Sin embargo, como mencionamos anteriormente, *B. abortus* es capaz de evadir al sistema inmune y establecer una infección crónica, usualmente asociada a una disminución en el recuento plaquetario. En este contexto de cronicidad, la presencia de plaquetas podría

favorecer la migración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica, iniciando la infección de células de la glía y la respuesta inmune inflamatoria asociada con la fisiopatología de la neurobrucelosis.

Referencias Bibliográficas

1. Moral, M. *Enfermedades infecciosas: Brucelosis*. *Guía para el equipo de salud* vol. 12 (Ministerio de Salud de la Nación, 2013).
2. Young, E. J. Human brucellosis. *Rev Infect Dis* **5**, 821–842 (1983).
3. Young, E. J. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* **21**, 283–9; quiz 290 (1995).
4. Samartino, L. E. Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* **90**, 71–80 (2002).
5. Moreno, E. Brucellosis in Central America. *Vet Microbiol* **90**, 31–38 (2002).
6. Whatmore, A. M. Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* vol. 9 1168–1184 (2009).
7. Michaux-Charachon, S. *et al.* Genome structure and phylogeny in the genus Brucella. *J Bacteriol* **179**, 3244–3249 (1997).
8. Jumas-Bilak. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus Brucella. *Mol. Microbiol.* **27**, 99–106 (1998).
9. Poetsch, A. & Marchesini, M. I. Proteomics of Brucella. *Proteomes* vol. 8 8 (2020).
10. Stranahan, L. W., Khalaf, O. H., Garcia-Gonzalez, D. G. & Arenas-Gamboa, A. M. Characterization of Brucella canis infection in mice. *PLoS One* **14**, (2019).
11. Pappas, G. The changing Brucella ecology: Novel reservoirs, new threats. *Int. J. Antimicrob. Agents* **36**, (2010).
12. Wattam, A. R. *et al.* Comparative Genomics of Early-Diverging Brucella Strains Reveals a Novel Lipopolysaccharide Biosynthesis Pathway. *MBio* **3**, (2012).
13. Zygmunt, M. S., Jacques, I., Bernardet, N. & Cloeckaert, A. Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging Brucella species. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 1370–1373 (2012).
14. Fernandez-Prada, C. M. *et al.* Interactions between Brucella melitensis and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun* **71**, 2110–2119 (2003).
15. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. & Tsianos, E. V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* **6**, 91–99 (2006).
16. Seleem, M. N., Boyle, S. M. & Sriranganathan, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol* **140**, 392–398 (2010).
17. Abriata. Boletin Epidemiológico Periodico N° 33: Edicion Especial Brucelosis. *Dir. Epidemiol.* (2005).
18. P, V., J, M. & MA, M. Human to Human Transmission of Brucella Melitensis. *Can. J. Infect. Dis.* **6**, (1995).
19. Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L. & Akritidis, N. Brucella as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2229–2236 (2006).
20. Khan, M. Y., Mah, M. W. & Memish, Z. A. Brucellosis in Pregnant Women. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1172–1177 (2001).
21. Young, E. J. Clinical manifestations of human brucellosis. in *Brucellosis Clinical and Laboratory Aspects* (eds. Young, E. J. & Corbel, M. J.) 97 (CRC Press, 1989).
22. Chevrel, J., Riojas, A., Lafargues, J. P., Sarlangue, J. & Barbier, R. Brucellose ostéoarticulaire et signes d'auto-immunité. *Arch. Pediatr.* **8**, 834–837 (2001).
23. Priest, J. R., Low, D., Wang, C. & Bush, T. Brucellosis and sacroiliitis: A common presentation of an uncommon pathogen. *J. Am. Board Fam. Med.* **21**, 158–161 (2008).
24. Kurdoglu, M. *et al.* Brucellosis in pregnancy: A 6-year clinical analysis. *Arch. Gynecol. Obstet.* **281**, 201–206 (2010).
25. Zheng, N. *et al.* Neurobrucellosis. *Int. J. Neurosci.* **128**, 55–62 (2018).

26. Corbel, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* **3**, 213–221 (1997).
27. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. I NNATE I MMUNE R ECOGNITION . *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
28. Fainboim, L. & Geffner, J. *Introducción a la inmunología humana*. (Editorial Médica Panamericana, 2005).
29. Busse, R. & Fleming, I. Vascular Endothelium and Blood Flow. in *The Vascular Endothelium II* 43–78 (Springer Berlin Heidelberg, 2006). doi:10.1007/3-540-36028-x_2.
30. Li, C. *et al.* Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. *Adv Hematol* **2012**, 384685 (2012).
31. Ley, K. & Reutershan, J. Leucocyte-Endothelial Interactions in Health and Disease. in *The Vascular Endothelium II* 97–133 (Springer Berlin Heidelberg, 2006). doi:10.1007/3-540-36028-x_4.
32. Bonfanti, R., Furie, B. C., Furie, B. & Wagner, D. D. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* **73**, 1109–12 (1989).
33. Middleton, J. *et al.* Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* **91**, 385–395 (1997).
34. Kuhlencordt, P. J. *et al.* Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: Insights from eNOS knockout endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **286**, (2004).
35. Cines, D. B. *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527–3561 (1998).
36. Lorant, D. E. *et al.* Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: A juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell Biol.* **115**, 223–234 (1991).
37. Evans, R. *et al.* Integrins in immunity. *Journal of Cell Science* vol. 122 215–225 (2009).
38. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* vol. 13 159–175 (2013).
39. Voisin, M. B. & Nourshargh, S. Neutrophil transmigration: Emergence of an adhesive cascade within venular walls. *Journal of Innate Immunity* vol. 5 336–347 (2013).
40. Potente, M. & Mäkinen, T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 18 477–494 (2017).
41. Macdonald, J. A., Murugesan, N. & Pachter, J. S. Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature. *J. Neurosci. Res.* **88**, 1457–1474 (2010).
42. Almutairi, M. M. A., Gong, C., Xu, Y. G., Chang, Y. & Shi, H. Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 73 57–77 (2016).
43. Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* vol. 14 392–404 (2014).
44. Anbazhagan, K., Duroux-Richard, I., Jorgensen, C. & Apparailly, F. Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human. *International Reviews of Immunology* vol. 33 470–489 (2014).
45. Stansfield, B. K. & Ingram, D. A. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin. Transl. Med.* **4**, (2015).
46. Qu, C., Brinck-Jensen, N. S., Zang, M. & Chen, K. Monocyte-derived dendritic cells: Targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *International Journal of Infectious Diseases* vol. 19 1–5 (2014).
47. Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V. & Kelsall, B. L. Inflammation switches the differentiation program of Ly6chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J. Exp. Med.*

209, 139–155 (2012).

48. Thiesen, S. *et al.* CD14 hi HLA-DR dim macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease . *J. Leukoc. Biol.* **95**, 531–541 (2014).
49. Carlin, L. M. *et al.* Nr4a1-dependent Ly6Clow monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* **153**, 362–375 (2013).
50. Turner, J. D. *et al.* Circulating CD14brightCD16+ 'Intermediate' Monocytes Exhibit Enhanced Parasite Pattern Recognition in Human Helminth Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, (2014).
51. Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C. C. & Hanna, R. N. Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1306–1316 (2015).
52. Clements, M. *et al.* Differential Ly6C Expression after Renal Ischemia-Reperfusion Identifies Unique Macrophage Populations. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 159–170 (2016).
53. Edwards, S. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. (2005).
54. Thomas, C. J. & Schroder, K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends in Immunology* vol. 34 317–328 (2013).
55. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 459–489 (2012).
56. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-.).* **303**, 1532–1535 (2004).
57. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231–241 (2007).
58. Kahn, F., Hurley, S. & Shannon, O. Platelets promote bacterial dissemination in a mouse model of streptococcal sepsis. *Microbes Infect* **15**, 669–676 (2013).
59. Clemetson, K. J. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res* **129**, 220–224 (2012).
60. Harrison, P. & Cramer, E. M. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* **7**, 52–62 (1993).
61. Berger, G., Masse, J. M. & Cramer, E. M. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood* **87**, 1385–1395 (1996).
62. Jurk, K. & Kehrel, B. E. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* **31**, 381–392 (2005).
63. Fox, J. E. The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* **70**, 884–893 (1993).
64. Kroll, M. H., Hellums, J. D., McIntire, L. V, Schafer, A. I. & Moake, J. L. Platelets and shear stress. *Blood* **88**, 1525–1541 (1996).
65. Nieswandt, B. & Watson, S. P. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* **102**, 449–461 (2003).
66. Andrews, R. K., Gardiner, E. E., Shen, Y. & Berndt, M. C. Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB Life* **56**, 13–18 (2004).
67. Xiong, J. P., Stehle, T., Goodman, S. L. & Arnaout, M. A. New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* **102**, 1155–1159 (2003).
68. Semple, J. W., Italiano Jr., J. E. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* **11**, 264–274 (2011).
69. Aslam, R. *et al.* Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood* **107**, 637–641 (2006).
70. Cognasse, F. *et al.* Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* **83**, 196–198 (2005).

71. Cox, D., Kerrigan, S. W. & Watson, S. P. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost* **9**, 1097–1107 (2011).
72. Yeaman, M. R., Bayer, A. S., Koo, S. P., Foss, W. & Sullam, P. M. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the Staphylococcus aureus cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *J Clin Invest* **101**, 178–187 (1998).
73. Yeaman, M. R., Tang, Y. Q., Shen, A. J., Bayer, A. S. & Selsted, M. E. Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infect Immun* **65**, 1023–1031 (1997).
74. Cole, A. M. *et al.* Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* **167**, 623–627 (2001).
75. Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* **23**, 177–189 (2009).
76. Gleissner, C. A., von Hundelshausen, P. & Ley, K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arter. Thromb Vasc Biol* **28**, 1920–1927 (2008).
77. Youssefian, T., Drouin, A., Masse, J. M., Guichard, J. & Cramer, E. M. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* **99**, 4021–4029 (2002).
78. Antczak, A. J., Vieth, J. A., Singh, N. & Worth, R. G. Internalization of IgG-coated targets results in activation and secretion of soluble CD40 ligand and RANTES by human platelets. *Clin Vaccine Immunol* **18**, 210–216 (2011).
79. Berthet, J. *et al.* Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol* **145**, 189–200 (2012).
80. Gudbrandsdottir, S., Hasselbalch, H. C. & Nielsen, C. H. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF-alpha secretion by monocytes. *J Immunol* **191**, 4059–4067 (2013).
81. Wuescher, L. M., Takashima, A. & Worth, R. G. A novel conditional platelet depletion mouse model reveals the importance of platelets in protection against Staphylococcus aureus bacteremia. *J Thromb Haemost* **13**, 303–313 (2015).
82. van Gils, J. M., Zwaginga, J. J. & Hordijk, P. L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* **85**, 195–204 (2009).
83. Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R. K. & Ley, K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* **21**, 99–111 (2007).
84. Li, N. *et al.* Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arter. Thromb Vasc Biol* **20**, 2702–2708 (2000).
85. Frenette, P. S. *et al.* P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* **191**, 1413–1422 (2000).
86. Smyth, S. S. *et al.* Beta(3)-integrin-deficient mice but not P-selectin-deficient mice develop intimal hyperplasia after vascular injury: correlation with leukocyte recruitment to adherent platelets 1 hour after injury. *Circulation* **103**, 2501–2507 (2001).
87. Fernandes, L. S. *et al.* Platelet-monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with alphaIIbbeta3 and alphaMbeta2, in coronary stenting. *Thromb Res* **111**, 171–177 (2003).
88. Evangelista, V. *et al.* Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood* **109**, 2461–2469 (2007).
89. Wang, H. B. *et al.* P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat Immunol* **8**, 882–892

(2007).

90. Miner, J. J. *et al.* Separable requirements for cytoplasmic domain of PSGL-1 in leukocyte rolling and signaling under flow. *Blood* **112**, 2035–2045 (2008).
91. da Costa Martins, P. A., van Gils, J. M., Mol, A., Hordijk, P. L. & Zwaginga, J. J. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. *J Leukoc Biol* **79**, 499–507 (2006).
92. Diacovo, T. G., Puri, K. D., Warnock, R. A., Springer, T. A. & von Andrian, U. H. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science (80-.).* **273**, 252–255 (1996).
93. Elzey, B. D. *et al.* Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* **19**, 9–19 (2003).
94. Gawaz, M. *et al.* Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* **98**, 1164–1171 (1998).
95. Weyrich, A. S., McIntyre, T. M., McEver, R. P., Prescott, S. M. & Zimmerman, G. A. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest* **95**, 2297–2303 (1995).
96. Weyrich, A. S. *et al.* Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* **97**, 1525–1534 (1996).
97. Dixon, D. A. *et al.* Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling. *J Clin Invest* **116**, 2727–2738 (2006).
98. Marcus, A. J. Transcellular metabolism of eicosanoids. *Prog Hemost Thromb* **8**, 127–142 (1986).
99. Folco, G. & Murphy, R. C. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol Rev* **58**, 375–388 (2006).
100. de Gaetano, G., Cerletti, C. & Evangelista, V. Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis* **29**, 41–49 (1999).
101. Evangelista, V. *et al.* Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation. *Thromb Haemost* **94**, 568–577 (2005).
102. Vanichakarn, P., Blair, P., Wu, C., Freedman, J. E. & Chakrabarti, S. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. *Thromb Res* **122**, 346–358 (2008).
103. Elzey, B. D., Sprague, D. L. & Ratliff, T. L. The emerging role of platelets in adaptive immunity. *Cell Immunol* **238**, 1–9 (2005).
104. Baldi, P. C. & Giambartolomei, G. H. Immunopathology of Brucella infection. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* **8**, 18–26 (2013).
105. Jiang, X., Leonard, B., Benson, R. & Baldwin, C. L. Macrophage control of Brucella abortus: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol* **151**, 309–319 (1993).
106. Barquero-Calvo, E. *et al.* Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One* **2**, e631 (2007).
107. Conde-Álvarez, R. *et al.* The lipopolysaccharide core of Brucella abortus acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
108. Barquero-Calvo. Neutrophil exert a supressive effect on TH1 responses to intracellular pathogen Brucella abortus. *PLoS One* **2(7)**, (2013).

109. Gutiérrez-Jiménez, C. *et al.* Neutrophils as trojan horse vehicles for brucella abortus macrophage infection. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
110. Laskay, T., Van Zandbergen, G. & Solbach, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology* vol. 11 210–214 (2003).
111. Kreutzer, D. L., Dreyfus, L. A. & Robertson, D. C. Interaction of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of Brucella abortus. *Infect. Immun.* **23**, 737–42 (1979).
112. Canning, P. C., Roth, J. A., Tabatabai, L. B. & Deyoe, B. L. Isolation of components of brucella abortus responsible for inhibition of function in bovine neutrophils. *J. Infect. Dis.* **152**, 913–921 (1985).
113. Braude, A. I. Studies in the pathology and pathogenesis of experimental brucellosis. *J. Infect. Dis.* **89**, 87–94 (1951).
114. Ackermann, M. R., Cheville, N. F. & Deyoe, B. L. Bovine Ileal Dome Lymphoepithelial Cells: Endocytosis and Transport of Brucella abortus Strain 19. *Vet. Pathol.* **25**, 28–35 (1988).
115. De Tejada, G. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Moriyon, I. The outer membranes of Brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect. Immun.* **63**, 3054–3061 (1995).
116. Zwerdling, A. *et al.* Brucella abortus activates human neutrophils. *Microbes Infect* **11**, 689–697 (2009).
117. Billard, E., Cazevieille, C., Dornand, J. & Gross, A. High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens Brucella suis, B. abortus, and B. melitensis. *Infect Immun* **73**, 8418–8424 (2005).
118. Salcedo, S. P. *et al.* Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog* **4**, e21 (2008).
119. Boura, P., Tsapas, G., Papadopoulou, A., Magoula, I. & Kountouras, G. Monocyte locomotion in anergic chronic brucellosis patients: the in vivo effect of ascorbic acid. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **11**, 119–129 (1989).
120. Zwerdling, A. *et al.* Brucella lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by Brucella abortus. *Microbes Infect* **10**, 1346–1354 (2008).
121. Dornand, J. *et al.* Impairment of intramacrophagic Brucella suis multiplication by human natural killer cells through a contact-dependent mechanism. *Infect Immun* **72**, 2303–2311 (2004).
122. Ning Gao, Jennings, P., Yuhong Guo & Yuan, D. Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to Brucella abortus. *Innate Immun.* **17**, 152–163 (2011).
123. Salmeron, I. *et al.* Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. *Clin Infect Dis* **15**, 764–770 (1992).
124. Fernandes, D. M., Benson, R. & Baldwin, C. L. Lack of a role for natural killer cells in early control of Brucella abortus 2308 infections in mice. *Infect Immun* **63**, 4029–4033 (1995).
125. Dorneles, E. M. S., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M. S. S., Sriranganathan, N. & Lage, A. P. Immune response triggered by Brucella abortus following infection or vaccination. *Vaccine* vol. 33 3659–3666 (2015).
126. Fernandes, D. M., Jiang, X., Jung, J. H. & Baldwin, C. L. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent Brucella abortus strain 2308 . *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**, 193–203 (1996).
127. Murphy, E. A., Sathiyaseelan, J., Parent, M. A., Zou, B. & Baldwin, C. L. Interferon-gamma is crucial for surviving a Brucella abortus infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology* **103**, 511–518 (2001).
128. Oliveira, S. C. & Splitter, G. A. CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular Brucella abortus infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur J Immunol* **25**, 2551–2557 (1995).

129. Durward, M. *et al.* Active Evasion of CTL Mediated Killing and Low Quality Responding CD8+ T Cells Contribute to Persistence of Brucellosis. *PLoS One* **7**, e34925 (2012).
130. Skyberg, J. A. *et al.* Murine and bovine γδ T cells enhance innate immunity against Brucella abortus infections. *PLoS One* **6**, (2011).
131. Winter, A. J., Duncan, J. R., Santisteban, C. G., Douglas, J. T. & Adams, L. G. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of Brucella abortus infection in mice. *Infect Immun* **57**, 3438–3444 (1989).
132. Elzer, P. H. *et al.* Antibody-mediated protection against Brucella abortus in BALB/c mice at successive periods after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19. *Immunology* **82**, 651–658 (1994).
133. Splitter, G. A. & Everlith, K. M. Brucella abortus regulates bovine macrophage-T-cell interaction by major histocompatibility complex class II and interleukin-1 expression. *Infect. Immun.* **57**, 1151–7 (1989).
134. Zhan, Y., Kelso, A. & Cheers, C. Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts. *Immunology* **80**, 458–464 (1993).
135. Zhan, Y. & Cheers, C. Differential induction of macrophage-derived cytokines by live and dead intracellular bacteria in vitro. *Infect Immun* **63**, 720–723 (1995).
136. Zhan, Y. & Cheers, C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to Brucella abortus infection. *Infect Immun* **61**, 4899–4901 (1993).
137. Zaitseva, M. B. *et al.* Human peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells express Th1-like cytokine mRNA and proteins following in vitro stimulation with heat-inactivated Brucella abortus. *Infect Immun* **63**, 2720–2728 (1995).
138. Skendros, P., Pappas, G. & Boura, P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes Infect* **13**, 134–142 (2011).
139. Zhan, Y. & Cheers, C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to Brucella abortus infection. *Infect Immun* **63**, 1387–1390 (1995).
140. Giambartolomei, G. H. *et al.* Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to Brucella cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *J Infect Dis* **186**, 252–259 (2002).
141. Akbulut, H. H., Kilic, S. S., Bulut, V. & Ozden, M. Determination of intracellular cytokines produced by Th1 and Th2 cells using flow cytometry in patients with brucellosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**, 253–258 (2005).
142. Rafiei, A. *et al.* Dominant Th1 cytokine production in early onset of human brucellosis followed by switching towards Th2 along prolongation of disease. *J Infect* **53**, 315–324 (2006).
143. Diaz, R., Jones, L. M., Leong, D. & Wilson, J. B. Surface antigens of smooth brucellae. *J. Bacteriol.* **96**, 893–901 (1968).
144. Bellaire, B. H., Roop 2nd, R. M. & Cardelli, J. A. Opsonized virulent Brucella abortus replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infect Immun* **73**, 3702–3713 (2005).
145. Jiang, X. & Baldwin, C. L. Effects of cytokines on intracellular growth of Brucella abortus. *Infect Immun* **61**, 124–134 (1993).
146. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. & Minick, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**, 2745–2756 (1973).
147. Pabuccuoglu, O. *et al.* Evaluation of serological tests for diagnosis of brucellosis. *Jpn. J. Infect. Dis.* **64**, 272–6 (2011).
148. Leech, M., Hutchinson, P., Holdsworth, S. R. & Morand, E. F. Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil migration and synovial P- selectin but not neutrophil phagocytic or oxidative function in experimental arthritis. *Clin.*

Exp. Immunol. **112**, 383–388 (1998).

149. Dang, L. H., Michalek, M. T., Takei, F., Benaceraff, B. & Rock, K. L. Role of ICAM-1 in antigen presentation demonstrated by ICAM-1 defective mutants. *J Immunol* **144**, 4082–4091 (1990).
150. Kaplanski, G. *et al.* Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood* **92**, 1259–67 (1998).
151. Alderson, M. R. *et al.* CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* **178**, 669–674 (1993).
152. Singh, M. V. *et al.* Characterization of Platelet–Monocyte Complexes in HIV-1–Infected Individuals: Possible Role in HIV-Associated Neuroinflammation. *J. Immunol.* **192**, 4674–4684 (2014).
153. Davidson, D. C., Jackson, J. W. & Maggirwar, S. B. Targeting platelet-derived soluble CD40 ligand: A new treatment strategy for HIV-associated neuroinflammation? *Journal of Neuroinflammation* vol. 10 (2013).
154. Ferrero, M. C. *et al.* Proinflammatory response of human endothelial cells to Brucella infection. *Microbes Infect* **13**, 852–861 (2011).
155. Lyck, R. & Enzmann, G. The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues. *Current Opinion in Hematology* vol. 22 53–59 (2015).
156. Miraglia, M. C. *et al.* Glial Cell–Elicited Activation of Brain Microvasculature in Response to Brucella abortus Infection Requires ASC Inflammasome–Dependent IL-1β Production . *J. Immunol.* **196**, 3794–3805 (2016).
157. Ramirez, S. H. *et al.* Dyad of CD40/CD40 ligand fosters neuroinflammation at the blood-brain barrier and is regulated via JNK signaling: Implications for HIV-1 encephalitis. *J. Neurosci.* **30**, 9454–9464 (2010).
158. Pollak, C. N., Delpino, M. V, Fossati, C. A. & Baldi, P. C. Outer membrane vesicles from Brucella abortus promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One* **7**, e50214 (2012).
159. Giambartolomei, G., Wallach, J., Encephalitis, P. B.- & 2007, undefined. Neurobrucellosis. *CRC Press*.
160. Miao, Z. *et al.* VEGF increases paracellular permeability in brain endothelial cells via upregulation of EphA2. *Anat. Rec.* **297**, 964–972 (2014).
161. Miraglia, M. C. *et al.* Brucella abortus Traverses Brain Microvascular Endothelial Cells Using Infected Monocytes as a Trojan Horse. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 200 (2018).
162. Garcia Samartino, C. *et al.* Brucella abortus induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis. *Am J Pathol* **176**, 1323–1338 (2010).
163. Bournazos, S., Rennie, J., Hart, S. P., Fox, K. A. & Dransfield, I. Monocyte functional responsiveness after PSGL-1-mediated platelet adhesion is dependent on platelet activation status. *Arter. Thromb Vasc Biol* **28**, 1491–1498 (2008).
164. Riaz, A. H., Tasma, B. E., Woodman, M. E., Wooten, R. M. & Worth, R. G. Human platelets efficiently kill IgG-opsonized E. coli. *FEMS Immunol Med Microbiol* **65**, 78–83 (2012).
165. Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**, 463–469 (2007).
166. Trotta, A. *et al.* Platelets Promote Brucella abortus Monocyte Invasion by Establishing Complexes With Monocytes. *Front Immunol* **9**, 1000 (2018).
167. Phillips, J. H., Chang, C. W. & Lanier, L. L. Platelet-induced expression of Fc gamma RIII (CD16) on human monocytes. *Eur J Immunol* **21**, 895–899 (1991).

168. Woller, G., Brandt, E., Mittelstädt, J., Rybakowski, C. & Petersen, F. Platelet factor 4/CXCL4-stimulated human monocytes induce apoptosis in endothelial cells by the release of oxygen radicals. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 936–45 (2008).
169. Lee, J. J. *et al.* Influence of platelet-activating factor receptor (PAFR) on Brucella abortus infection: implications for manipulating the phagocytic strategy of B. abortus. *BMC Microbiol* **16**, 70 (2016).
170. Xiang, B. *et al.* Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nat Commun* **4**, 2657 (2013).
171. Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C. & Lo-Man, R. Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory Properties of Neutrophils. *Immunity* **31**, 761–771 (2009).
172. Silva, M. T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 93–106 (2010).
173. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* vol. 11 519–531 (2011).
174. Spörri, R., Joller, N., Hilbi, H. & Oxenius, A. A Novel Role for Neutrophils As Critical Activators of NK Cells. *J. Immunol.* **181**, 7121–7130 (2008).
175. Yang, C.-W., Strong, B. S. I., Miller, M. J. & Unanue, E. R. Neutrophils Influence the Level of Antigen Presentation during the Immune Response to Protein Antigens in Adjuvants. *J. Immunol.* **185**, 2927–2934 (2010).
176. Jan Lood, C. *et al.* Article 1867 (2019) Platelets Aggregate With Neutrophils and Promote Skin Pathology in Psoriasis. *Front. Immunol* **10**, 1867 (2019).
177. Dopheide, J. F. *et al.* Leukocyte–platelet aggregates—a phenotypic characterization of different stages of peripheral arterial disease. *Platelets* **27**, 658–667 (2016).
178. Riley, L. K. & Robertson, D. C. Brucellacidal activity of human and bovine polymorphonuclear leukocyte granule extracts against smooth and rough strains of Brucella abortus. *Infect Immun* **46**, 231–236 (1984).
179. Jy, W., Mao, W. W., Horstman, L. L., Tao, J. & Ahn, Y. S. Platelet Microparticles Bind, Activate and Aggregate Neutrophils In Vitro. *Blood Cells, Mol. Dis.* **21**, 217–231 (1995).
180. Assinger, A. *et al.* Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 799–809 (2011).
181. Sreeramkumar, V. *et al.* Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science (80-.).* **346**, 1234–1238 (2014).
182. Etulain, J. *et al.* P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* **126**, 242–246 (2015).
183. Kral, J. B., Schrottmaier, W. C., Salzmann, M. & Assinger, A. Platelet Interaction with Innate Immune Cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* vol. 43 78–88 (2016).
184. Stevens, M. G., Pugh, G. W. & Tabatabai, L. B. Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing Brucella abortus infections in mice. *Infect. Immun.* **60**, 4407–9 (1992).
185. Schmielau, J. & Finn, O. J. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* **61**, 4756–4760 (2001).
186. Moore, K. L., Varki, A. & McEver, R. G. GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: Evidence for a lectin-like interaction. *J. Cell Biol.* **112**, 491–499 (1991).
187. Larsen, E. *et al.* PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell* **63**, 467–474 (1990).
188. Hamburger, S. A. & McEver, R. P. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* **75**,

550–554 (1990).

189. Moore, K. L. *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J. Cell Biol.* **128**, 661–671 (1995).
190. Page, C. & Pitchford, S. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 1176–1184 (2013).
191. Blomgran, R., Desvignes, L., Briken, V. & Ernst, J. D. Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell Host Microbe* **11**, 81–90 (2012).
192. Cassatella, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* **16**, 21–26 (1995).
193. Zhu, X., Tan, Z., Chen, J., Zhu, M. & Xu, Y. Effects of ropivacaine on adhesion molecule CD11b expression and function in human neutrophils. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 662–7 (2010).
194. Read, R. A. *et al.* Platelet-activating factor-induced polymorphonuclear neutrophil priming independent of CD11(B) adhesion. *Surgery* **114**, 308–313 (1993).
195. Lishko, V. K., Yakubenko, V. P., Ugarova, T. P. & Podolnikova, N. P. Leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18, αMβ2, CR3) acts as a functional receptor for platelet factor 4. *J. Biol. Chem.* **293**, 6869–6882 (2018).
196. Tateda, K. *et al.* Early Recruitment of Neutrophils Determines Subsequent T1/T2 Host Responses in a Murine Model of Legionella pneumophila Pneumonia . *J. Immunol.* **166**, 3355–3361 (2001).
197. Fortin, C. F., Lesur, O. & Fulop, T. Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: Activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. *Int. Immunol.* **19**, 41–50 (2007).
198. Radsak, M. P., Salih, H. R., Rammensee, H.-G. & Schild, H. Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 in Neutrophil Inflammatory Responses: Differential Regulation of Activation and Survival. *J. Immunol.* **172**, 4956–4963 (2004).
199. Haselmayer, P., Grosse-Hovest, L., Von Landenberg, P., Schild, H. & Radsak, M. P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* **110**, 1029–1035 (2007).
200. Martinez de Tejada, G., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Moriyon, I. The outer membranes of Brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* **63**, 3054–3061 (1995).
201. Brandt, E. *et al.* The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 471–8 (2000).
202. Walz, A., Dewald, B., von Tscharner, V. & Baggiolini, M. Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. *J. Exp. Med.* **170**, 1745–50 (1989).
203. Grommes, J. *et al.* Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 628–36 (2012).
204. Palmantier, R. & Borgeat, P. Thrombin-activated platelets promote leukotriene B4 synthesis in polymorphonuclear leucocytes stimulated by physiological agonists. *Br. J. Pharmacol.* **103**, 1909–16 (1991).
205. Arnout, J., Hoylaerts, M. F. & Lijnen, H. R. Haemostasis. in *The Vascular Endothelium II* 1–41 (Springer Berlin Heidelberg, 2006). doi:10.1007/3-540-36028-X_1.
206. Minshall, R. D. & Malik, A. B. Transport Across the Endothelium: Regulation of Endothelial Permeability. in *The Vascular Endothelium I* 107–144 (Springer Berlin Heidelberg, 2006). doi:10.1007/3-540-32967-6_4.
207. Ferrero, M. C. *et al.* Proinflammatory response of human endothelial cells to Brucella infection. *Microbes Infect.* **13**, 852–61 (2011).

208. Pober, J. S. & Sessa, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology* vol. 7 803–815 (2007).
209. Vieira-de-Abreu, A., Campbell, R. A., Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. A. Platelets: Versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Seminars in Immunopathology* vol. 34 5–30 (2012).
210. Henn, V. *et al.* CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**, 591–594 (1998).
211. Cox, D. & McConkey, S. The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 67 557–568 (2010).
212. Fitzgerald, J. R., Foster, T. J. & Cox, D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* **4**, 445–457 (2006).
213. Zuchtriegel, G. *et al.* Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biol.* **14**, e1002459 (2016).
214. Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science (80-.).* **327**, 580–583 (2010).
215. Langer, H. F. *et al.* Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Circ. Res.* **110**, 1202–1210 (2012).
216. Pitchford, S. C. *et al.* Allergen induces the migration of platelets to lung tissue in allergic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 604–612 (2008).
217. Ghasemzadeh, M. *et al.* The CXCR1/2 ligand NAP-2 promotes directed intravascular leukocyte migration through platelet thrombi. *Blood* **121**, 4555–4566 (2013).
218. Kornerup, K. N., Salmon, G. P., Pitchford, S. C., Liu, W. L. & Page, C. P. Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. *J. Appl. Physiol.* **109**, 758–767 (2010).
219. De Sanctis, G. T. *et al.* Reduction of allergic airway responses in P-selectin-deficient mice. *J. Appl. Physiol.* **83**, 681–687 (1997).
220. Sun, Y. *et al.* Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction* vol. 35 600–604 (2015).
221. Aramoto, H., Breslin, J. W., Pappas, P. J., Hobson, R. W. & Durán, W. N. Vascular endothelial growth factor stimulates differential signaling pathways in in vivo microcirculation. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **287**, (2004).
222. Barone, F. C. *et al.* Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia. *Medicinal Research Reviews* vol. 21 129–145 (2001).
223. Sevinc, A., Buyukberber, N., Camci, C., Buyukberber, S. & Karsligil, T. Thrombocytopenia in brucellosis: case report and literature review. *J Natl Med Assoc* **97**, 290–293 (2005).
224. Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H. & Smits, H. L. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis* **7**, 775–786 (2007).