



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

“Mecanismos de evasión de *Klebsiella pneumoniae*
multirresistente a los antimicrobianos sobre la
respuesta inmune innata”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Federico Birnberg Weiss

Directora de Tesis: Dra. Gabriela C. Fernandez

Consejera de estudios: Dra. Mirta Schattner

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología de los Procesos Inflamatorios -
Instituto de Medicina Experimental (IMEX) – CONICET. Academia Nacional de
Medicina de Buenos Aires.

Buenos Aires, junio 2025

“Mecanismos de evasión de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente a los antimicrobianos sobre la respuesta inmune innata”

Palabras clave: Neutrófilos – *Klebsiella pneumoniae* KPC – Evasión inmune

Resumen

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) representan una de las primeras líneas de defensa frente a infecciones bacterianas. Son las primeras células en arribar al foco infeccioso, donde son capaces de reconocer los patógenos, internalizarlos y mediar su muerte de manera tanto intracelular como extracelular.

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gram negativa con gran incidencia en infecciones nosocomiales en todo el mundo, asociadas principalmente a cepas multirresistentes. Son de particular relevancia las *Klebsiella pneumoniae* del Secuencio Tipo 258 (ST258), un clon endémico de Argentina y resistente a los carbapenems, antimicrobianos de último recurso, por la presencia de la enzima carbapenemasa de *K. pneumoniae* (KPC).

El dramático escenario que plantea el aumento de las infecciones causadas por bacterias multirresistentes ha despertado un especial interés por el estudio de la respuesta inmune frente a este tipo de microorganismos, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas y el desarrollo de vacunas para prevenir las infecciones causadas por ellos. Por esta razón, es fundamental conocer en detalle cómo *Klebsiella pneumoniae* multirresistente puede evadir la respuesta inmune, con el fin de proporcionar estrategias alternativas o complementarias al uso de fármacos y así combatir las infecciones por este patógeno oportunista de gran éxito. Partiendo de la hipótesis de que *Klebsiella pneumoniae* KPC ST258 es capaz de evadir la respuesta del PMN, nuestro objetivo fue comprender el impacto de *Klebsiella pneumoniae* KPC ST258 sobre la respuesta microbicida del PMN.

En primer lugar, observamos que PMN humanos purificados de sangre periférica no son capaces de eliminar a *Klebsiella pneumoniae* KPC ST258 (Kp). En línea con esto, demostramos que Kp no induce la formación de trampas

extracelulares de neutrófilos (NETs), un mecanismo microbicida extracelular clave, y además es capaz de inhibir la formación de NETs inducidas por diversos estímulos positivos bien conocidos. La presencia de componentes de sangre periférica, capaces de potenciar la respuesta inmune, como son los anticuerpos naturales y las plaquetas, no lograron revertir la inhibición de la formación de NETs por parte de Kp. En búsqueda del mecanismo detrás de esta inhibición, observamos que aún en presencia de una gran producción de ROS por parte de los PMN, Kp continúa inhibiendo la formación de NETs. Sin embargo, descubrimos que Kp impide la correcta migración de la elastasa desde los gránulos azurófilos hacia el núcleo, un paso clave en la formación de NETs. Profundizando en los posibles destinos celulares de los gránulos que contienen a la elastasa, encontramos que Kp afecta su movimiento en general ya que no se observó una fusión de los gránulos azurófilos con los fagosomas que contienen a la bacteria ni su contenido es liberado al medio extracelular. Como consecuencia de estos fenómenos, demostramos que la bacteria es capaz de persistir dentro del PMN así como también continuar su crecimiento extracelularmente. Finalmente, reportamos que Kp afecta la polimerización de actina, así como funciones de los PMN relacionadas con el citoesqueleto.

En conclusión, descubrimos que Kp posee un mecanismo de evasión de la respuesta microbicida de los PMN a partir de su impacto en la funcionalidad de los gránulos azurófilos y, en particular, de la movilización intracelular de la elastasa. Este proceso da lugar a dos consecuencias: que una bacteria típicamente extracelular pueda sobrevivir intracelularmente y una mayor capacidad de diseminación extracelular.

“Evasion mechanisms of antimicrobial multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* on innate immune response”

Keywords: Neutrophils – *Klebsiella pneumoniae* KPC – Immune evasion

Abstract

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) represent one of the first lines of defense against bacterial infections. They are the first cells to arrive at the infection site, where they are able to recognize pathogens, internalize them and mediate their death both intracellularly and extracellularly.

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative bacterium with a high incidence of nosocomial infections worldwide, mainly associated with multidrug-resistant strains. Of particular relevance is *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 (ST258), an endemic clone in Argentina resistant to carbapenems, antimicrobials of last resort, due to the presence of the *K. pneumoniae* carbapenemase enzyme (KPC).

The dramatic scenario posed by the increase in infections caused by multidrug-resistant bacteria has aroused special interest in the study of the immune response against this type of microorganism, the search for new therapeutic strategies and the development of vaccines to prevent infections caused by them. For this reason, it is essential to understand in detail how multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* can evade the immune response, in order to provide alternative or complementary strategies to the use of drugs and thus combat infections caused by this highly successful opportunistic pathogen. Based on the hypothesis that *Klebsiella pneumoniae* ST258 KPC (Kp) is able to evade the PMN response, we aimed to understand the mechanisms by which Kp inhibits the PMN response.

First, we observed that human PMN purified from peripheral blood were not able to kill Kp. In line with this, we showed that Kp did not induce neutrophil extracellular traps (NETs) formation, a key extracellular microbicidal mechanism, and was also able to inhibit the formation of NETs induced by other well-known positive stimuli. Components present in peripheral blood capable of enhancing the immune response, such as natural antibodies and platelets, failed to reverse

the inhibition of NETs formation by Kp. Seeking the mechanism behind this inhibition, we observed that even in the presence of high ROS production by PMN, Kp continued to inhibit NETs formation. Moreover, we found that Kp prevented the proper migration of elastase from the azurophilic granules to the nucleus, a key step in NETs formation.

Deepen into the possible cellular localization of granules that contained elastase, we found that Kp affected their general movement: they were neither found in the phagosomes that contain the bacteria nor were released into the extracellular milieu. Consequently, this allowed Kp to persist within PMN as well as to continue growing extracellularly. Finally, we found that Kp affected actin polymerization, as well as PMN functions related to the cytoskeleton.

In conclusion, Kp evades the microbicidal response of PMN by affecting the intracellular mobilisation of azurophilic granules and, in particular, elastase. This process has two consequences: increased intracellular survival of a typical extracellular bacterium and an increased ability to disseminate.

Parte de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis dieron origen a las siguientes publicaciones:

1. Birnberg-Weiss, F., Castillo, L. A., Pittaluga, J. R., Martire-Greco, D., Gómez, S. A., Landoni, V. I., & Fernández, G. C. (2021). *Modulation of neutrophil extracellular traps release by Klebsiella pneumoniae*. Journal of leukocyte biology, 109(1), 245–256. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MA0620-099R>.
2. Birnberg-Weiss, F., Castro, J. E., Pittaluga, J. R., Castillo, L. A., Martire-Greco, D., Fuentes, F., Bigi, F., Gómez, S. A., Landoni, V. I., & Fernández, G. C. (2025). *Klebsiella pneumoniae ST258 impairs intracellular elastase mobilization and persists within human neutrophils*. Microbiological research, 292, 128035. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.128035>.

AGRADECIMIENTOS

A mis viejos, Laura y Eddy, y a mi hermano, Luqui, por el amor y la escucha, por los abrazos y el aguante, en cada momento.

A Gabi, eternamente agradecido por todo este recorrido. Por confiar desde el primer momento y tener siempre el tiempo para seguir charlando, pensando, proponiendo. Por la empatía, el cariño para hacer las cosas, por haber mantenido siempre un espacio de trabajo que se siente como familia.

A Vero, gracias por tu mirada crítica de cada aspecto de la vida. Por enriquecer el espacio de trabajo con debates y hermosas discusiones, por las risas y tu paciencia, haces del laboratorio un lugar especial.

A Pau, gracias por ese amor tan grande por la ciencia, el instituto y las personas. Por tu mirada atenta, las charlas sobre tantos temas y tu generosidad infinita.

A la banda de Inmuno 1, gracias por haber hecho tan feliz este recorrido. Agus, Cari, Flor, Marian, Joa, Fer, Alan: por la solidaridad, las risas, charlas infinitas, muchísimos momentos hermosos, por estar al lado siempre. Joss, Yas, Jor, Cami, gracias por el aguante, el empuje, por seguir dando vida al laboratorio.

A Luis, por ser un hermano mayor para mí, por hacer posible mis primeros pasos en ciencia, por todo el cariño y paciencia con la que me enseñaste tantas cosas. A Aye, Nahu, Dai, por la generosidad y la buena onda, por hacer de Inmuno 1 un lugar tan cálido.

A Gra y Evelia, porque sin ustedes no se puede imaginar al laboratorio. Gracias por ese trabajo diario, por el amor con el que nos ayudan. Junto con ustedes, agradecerle al personal de la Academia y las personas del IMEX que acompañaron día a día estos años. Imposible no agradecer a la generosidad del grupo Trevani y a la dedicación y solidaridad de Flor, Ire y Maiu, que desde el primer día y por tantos años me ayudaron y enseñaron tanto.

A los amigos, de hoy y siempre, y especialmente a la querida chancha, gracias infinitas. Es imposible imaginarme la vida sin ustedes.

A Jo, gracias por haber cambiado mis días con tu alegría, empuje y entusiasmo. Tu amor es una motivación para seguir cada día, así como también un refugio y un sostén.

Gracias a la universidad pública, a la Facultad de Exactas y a todas las personas que defienden la educación y la ciencia todos los días, son una inspiración y un orgullo.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	6
INDICE.....	7
ABREVIATURAS.....	10
BREVE INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	11
INTRODUCCIÓN.....	14
1. La respuesta inmune innata.....	14
2. Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN).....	14
2.1. Generalidades.....	14
2.2. Reclutamiento de los PMN al foco infeccioso.....	15
2.3. Mecanismos microbicidas del PMN.....	18
2.3.1. Fagocitosis.....	18
2.3.2. Mecanismos de muerte intracelular: producción de especies reactivas del oxígeno y acción de proteínas antimicrobianas.....	19
2.3.3. Mecanismos de muerte extracelular: liberación de gránulos y formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs).....	23
2.3.3.1. NETs suicidas o líticas.....	25
2.3.3.2. NETs vitales o no líticas.....	29
2.4. Evasión de la respuesta microbicida.....	31
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
3.1. Generalidades.....	33
3.2. Multirresistencia a los antimicrobianos.....	34
3.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST258 KPC ⁺	37
3.4. Respuesta inmune frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
4. Resultados previos del grupo.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
1. Bacterias utilizadas y condiciones de crecimiento	44
2. Generación de bacterias recombinantes expresando la Proteína Verde Fluorescente (GFP).....	46

3. Aspectos éticos y obtención de las muestras de sangre.....	47
4. Purificación de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN).....	47
5. Aislamiento de plaquetas (PLT) y parámetros de activación.....	47
6. Obtención de suero humano y opsonización	48
7. Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	48
8. Formación de Trampas Extracelulares de Neutrofilos (NETs).....	49
8.1. Determinación de NETs por microscopía confocal.....	50
8.2. Medición de ADN doble cadena (ADNdc) y la Actividad MPO.....	50
9. Actividad de la elastasa del neutrófilo.....	51
10. Localización intracelular de la elastasa por microscopía confocal.....	52
11. Análisis a través de imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	53
12. Eliminación intracelular bacteriana por recuento de UFC.....	53
13. Evaluación de la actividad bactericida total por recuento de UFC.....	54
14. Ensayo de fagocitosis.....	54
15. Ensayo de <i>time lapse</i>	55
16. Evaluación de la degranulación de gránulos azurófilos.....	55
17. Polimerización de actina por citometría de flujo.....	55
18. Evaluación de la quimiotaxis hacia fMLP.....	56
19. Análisis estadísticos.....	56
RESULTADOS.....	57
CAPITULO 1 – Estudio de la formación de NETs frente a Kp.....	57
1.1. Los PMN no son capaces de contener a Kp.....	57
1.2. Estudiar el efecto de Kp sobre los distintos tipos de NETs	60
1.2.1. Kp es capaz de inhibir la formación de NETs suicidas NOX-dependientes.....	60
1.2.2. Kp inhibe la formación de NETs suicidas NOX-independientes y NETs vitales.....	67
1.3. Determinar la capacidad de componentes séricos de modular la falta de NETs en presencia de Kp.....	71
1.3.1. La presencia de anticuerpos naturales no revierte la falta de NETs.....	71

1.3.2. Las plaquetas se activan frente a Kp, pero son incapaces de revertir la falta de NETs.....	78
1.3.3. Kp no induce la formación de NETs en sangre entera.....	82
1.4. Dilucidar el impacto de Kp sobre los pasos necesarios para la formación de NETs.....	83
1.4.1. Kp inhibe la formación de NETs aún en presencia de ROS...	83
1.4.2. La elastasa no es capaz de migrar desde los gránulos azurófilos hacia el núcleo.....	85
CAPITULO 2 – Estudio del impacto de Kp sobre la movilización de los gránulos azurófilos.....	89
2.1. Kp afecta la movilización de la elastasa hacia los fagosomas que contienen la bacteria.....	89
2.2. Kp afecta la movilización de los gránulos azurófilos hacia la membrana plasmática.....	93
2.3. Kp interfiere con la polimerización de actina.....	94
2.4. Kp no es eliminada intracelularmente y persiste dentro de los PMN.....	102
DISCUSIÓN.....	107
Modelo propuesto de los mecanismos de evasión de Kp sobre el PMN....	123
BIBLIOGRAFÍA.....	125

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATCC: del inglés “American Type Culture Collection”

CLR: receptor de lectina tipo C

DHR: dihidrorodamina

Eco: *Escherichia coli*

ES: error estándar

FSC: *Forward scatter*

GFP: del inglés “Green Fluorescent Protein”, proteína verde fluorescente

HS: pool de sueros humanos de complementados

IL: interleuquina

IMF: intensidad media de fluorescencia

Iono: Ionomicina

Kp: *Klebsiella pneumoniae* KPC ST258

KPC: enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa

Kp-HS: Kp pre-incubada con HS

Kpn Hv: *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta

MPO: mieloperoxidasa

NE: del inglés “neutrophil elastase”, elastasa

NETs: trampas extracelulares de neutrófilos

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PLT: plaqueta

PMA: del inglés “Phorbol 12-myristate 13-acetate”

PMN: polimorfonuclear neutrófilo

ROS: del inglés “Reactive oxygen species”, especies reactivas del oxígeno

RRPs: receptores de reconocimiento de patrones

Sau: *Staphylococcus aureus*

SSC: *Size scatter*

ST: del inglés “Sequence Type”, secuenciotipo

TLR: del inglés “Toll-like receptor”, receptor tipo Toll

UFC: unidades formadoras de colonias

BREVE INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) son células fundamentales de la respuesta inmune innata, constituyendo una de las primeras líneas de defensa frente a bacterias de vida extracelular. Frente a una infección, son las primeras células en arribar al tejido, con el fin de contener y erradicar al patógeno ¹.

En el foco infeccioso, los PMN son capaces de reconocer y fagocitar patógenos mediante diversos receptores de membrana. Fundamentalmente, los PMN logran mediar la muerte de los patógenos a través de distintos mecanismos tanto intracelulares como extracelulares ².

Dentro de las funciones microbidas de los PMN se puede destacar el rol de los gránulos azurófilos o primarios, uno de los cuatro tipos de gránulos de los PMN, los cuales contienen el mayor arsenal microbida. Considerando el contenido de estos gránulos azurófilos, podemos destacar a la elastasa del neutrófilo (NE) y a la mieloperoxidasa (MPO), dos proteínas con participación en distintos mecanismos microbidas del PMN. El contenido de estos gránulos puede ser liberado al exterior dando lugar a la muerte extracelular de patógenos, en un proceso denominado degranulación. También, su contenido puede liberarse en los fagosomas donde se internalizaron los patógenos, mediando su muerte intracelular. Finalmente, la elastasa, y luego MPO, pueden migrar hacia el núcleo. Allí dan lugar a la descondensación del ADN, lo cual conlleva a la ruptura de la membrana nuclear y así a la formación y liberación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), un mecanismo extracelular de muerte y contención de patógenos, descrito hace poco más de 20 años ³.

Las infecciones por bacterias multirresistentes presentan un gran desafío para la salud pública: su incidencia se encuentra en continuo aumento y actualmente son responsables de más de 1 millón de muertes al año. En este contexto, el estudio de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC), una de las bacterias multirresistentes perteneciente al grupo crítico de estudio según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus últimos informes (2017, 2024) ^{4,5} ha tomado mucha relevancia.

Existen distintos secuenciotipos (ST) de *Klebsiella pneumoniae* que son multirresistentes y relevantes para la salud pública ⁶. En particular, el ST258 ha sido clasificado como el principal responsable de la diseminación de la enzima KPC y es un clon endémico y predominante en Argentina desde el año 2006 ⁷.

Ante la falta de alternativas terapéuticas a partir de la multirresistencia, la respuesta anti bacteriana del sistema inmune, y en particular de los PMN, es fundamental para lograr erradicar las infecciones mediadas por estas bacterias. Sin embargo, diversos mecanismos de evasión de la respuesta de los PMN han sido descritos a lo largo de los años y estas bacterias no son la excepción ⁸. Nuestro grupo ha estudiado la interacción entre *Klebsiella pneumoniae* KPC ST258 (Kp) y los PMN durante los últimos años. Logramos determinar que los PMN se activan frente a Kp y logran fagocitarla, pero la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) es pobre y la bacteria no puede ser eliminada a tiempos tempranos ⁹.

El preocupante incremento de infecciones provocadas por bacterias multirresistentes ha generado un creciente interés en el estudio de la respuesta inmune frente a estos microorganismos, así como en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas para prevenir las infecciones que provocan. En este contexto, resulta esencial entender cómo *Klebsiella pneumoniae* multirresistente logra eludir la respuesta inmune, con el propósito de desarrollar enfoques alternativos o complementarios al uso de antibióticos, y así hacer frente a las infecciones causadas por este patógeno oportunista de notable prevalencia. La **hipótesis** de este trabajo es que Kp tiene la capacidad de evadir la respuesta microbicida de los PMN a través de distintos mecanismos.

Por lo tanto, el **objetivo central** de este proyecto es estudiar los posibles mecanismos a través de los cuales Kp inhibe la respuesta microbicida de los PMN.

A continuación, se definen los **objetivos específicos**:

1- Estudio de la formación y liberación de NETs frente a Kp

- Analizar la capacidad de los PMN de contener a Kp
- Estudiar el efecto de Kp sobre los distintos tipos de formación de NETs
- Determinar la capacidad de componentes séricos de modular la formación de NETs en presencia de Kp
- Dilucidar el impacto de Kp sobre los pasos necesarios para la formación de NETs

2- Estudio del impacto de Kp sobre la movilización de los gránulos azurófilos

- Evaluar la movilización de los gránulos azurófilos hacia los fagosomas que contienen a Kp
- Evaluar la movilización de los gránulos azurófilos hacia la membrana plasmática, en presencia de Kp
- Estudiar el efecto de Kp sobre un proceso relevante para la movilización de los gránulos del PMN como es la polimerización de actina
- Determinar las consecuencias del impacto de Kp sobre la movilización de los gránulos azurófilos: eliminación intracelular o persistencia.

INTRODUCCIÓN

1. La respuesta inmune innata

La inmunidad innata representa uno de los dos mecanismos fundamentales de defensa frente a patógenos en humanos ¹⁰. Es un sistema altamente conservado a lo largo de la evolución, encontrándose algunos de sus mecanismos desde organismos unicelulares hasta eucariotas inferiores y plantas ¹¹. En humanos, las barreras anatómicas del cuerpo, como la piel y las mucosas, junto con los factores liberados por las mismas, representan la primera barrera ante el encuentro con la inmensa diversidad de microorganismos que nos rodea. Siendo superada esta primera barrera, componentes celulares y humorales, protagonistas de la respuesta inmune innata, toman relevancia tanto en la erradicación o contención del patógeno, así como también en orientar el curso de la respuesta inmune adaptativa. Finalmente, la inmunidad innata presenta mecanismos anti-inflamatorios o reparadores, que permitirán reducir el daño tisular y retornar a la homeostasis ¹.

En el comienzo de la respuesta inmune anti-bacteriana, la activación del complemento y la opsonización del patógeno por anticuerpos (naturales o pre-formados), junto con el reconocimiento del patógeno o señales de daño tisular, darán lugar al inicio de la respuesta inflamatoria, orquestada por las células residentes de tejido. Esta respuesta inflamatoria, entre otras cosas, permite reclutar células especializadas hacia el sitio de infección. En este sentido, cuando se trata de bacterias extracelulares, los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) representan una de las células fundamentales en la contención y/o erradicación del patógeno, pudiendo desplegar todo su arsenal microbicida.

2. Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN)

2.1. Generalidades

Los PMN o neutrófilos forman parte del conjunto de células inmunes provenientes del linaje mieloide, caracterizándose por tener un núcleo multilobulado y una gran concentración de gránulos en el citoplasma, por lo que también se los conoce como granulocitos. Junto a ellos se suele agrupar a los

eosinófilos y basófilos, pero éstos difieren principalmente en su composición y función, a pesar de presentar una morfología similar. Dentro de los leucocitos, en humanos los PMN constituyen la mayoría de células en la sangre periférica, conformando entre el 50% y el 70% de los leucocitos en circulación ¹², aunque una gran proporción de ellos se encuentran asociados al endotelio vascular conformando el pool marginal de PMN ^{2,13}. La vida media de los PMN es relativamente corta (6-12 horas) aunque aumenta si éstas células son activadas ¹⁴. Históricamente se ha considerado que los PMN mueren en los tejidos luego de haber desplegado sus mecanismos microbicidas (no pueden recircular), pero cabe mencionar que este paradigma fue discutido en los últimos años, encontrándose incluso PMN presentando antígenos en ganglios linfáticos ^{15,16}. La abundancia de estas células se debe a que aproximadamente 10^{11} PMN se generan por día en la médula ósea a partir del precursor común mieloide. Y este número puede aumentar cuando se dispara la inflamación y la respuesta de fase aguda ¹³.

2.2 Reclutamiento de los PMN al foco infeccioso

Las células endoteliales, junto con las constituyentes del tejido (parénquima), así como las células residentes de tejido como son los macrófagos, representan las primeras células en detectar que un patógeno ha ingresado al organismo. La presencia de factores asociados a daño celular (conocidos como DAMPs), así como el reconocimiento de estructuras típicas de los microorganismos (o PAMPs) son las señales que dan lugar al inicio de la respuesta inflamatoria ^{17,18}.

En este sentido, al establecerse el foco infeccioso, se producen y liberan diversos factores que no sólo activan a las células allí presentes, sino que también atraen a las células inmunes hacia el tejido infectado. En este contexto, los PMN son los primeros leucocitos en ser reclutados al foco infeccioso desde la circulación. Sin embargo, para acceder al tejido infectado, y así alcanzar al patógeno, deben primero interactuar con las células endoteliales.

Las células endoteliales se encuentran cubriendo el interior de los vasos sanguíneos, conformando la separación física entre la circulación y los tejidos,

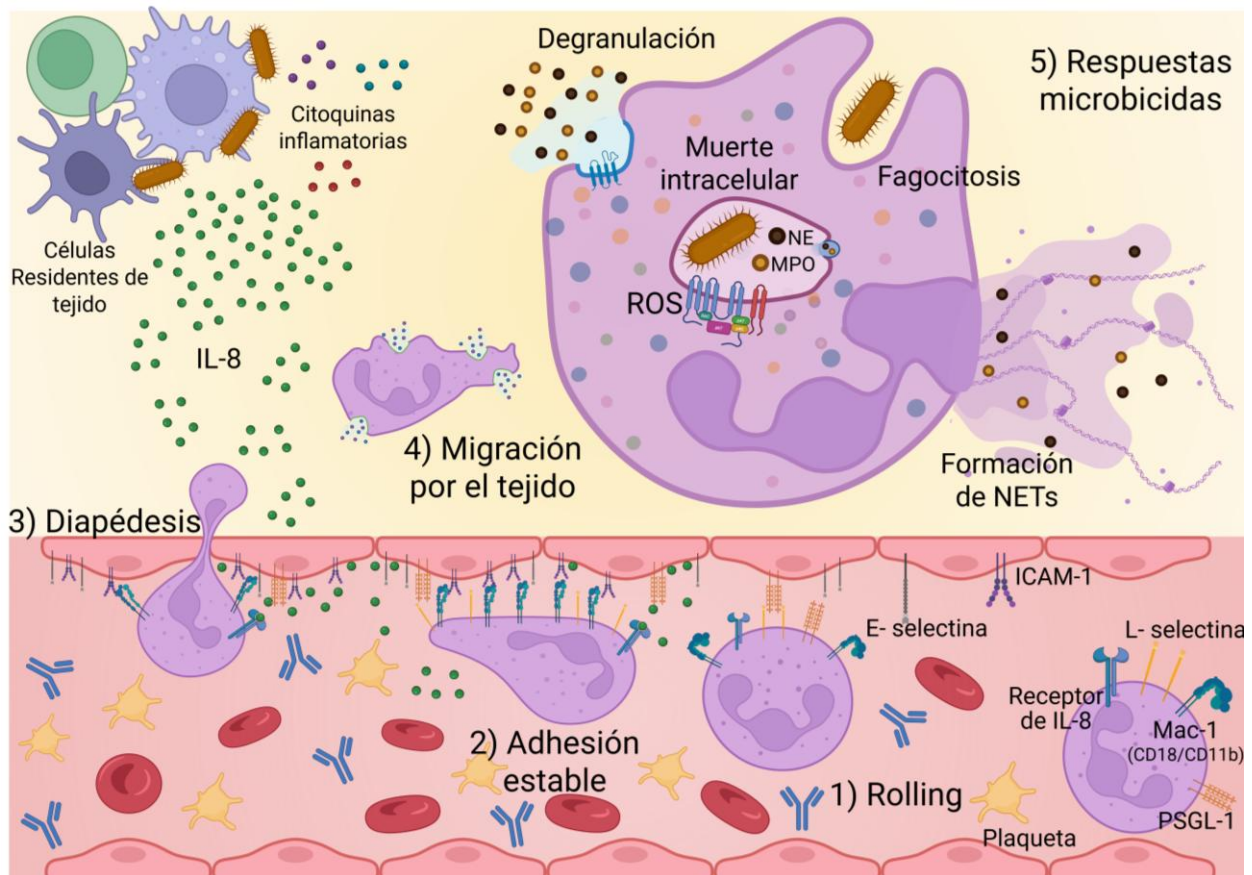
pero también cumpliendo un importante rol en el mantenimiento de la homeostasis y de los procesos inflamatorios ¹⁹. En condiciones basales presentan mecanismos que impiden la inflamación y activación de las células inmunes, mientras que al establecerse una infección cambia su perfil de expresión de proteínas, favoreciendo el estado inflamatorio y el reclutamiento de las células del sistema inmune ²⁰.

En condiciones homeostáticas, los PMN interactúan débilmente con PSGL-1 y E-selectina, presente en las células endoteliales, a través de L-Selectina o la misma PSGL-1 del PMN, en un proceso conocido como *rolling* (ver **Esquema 1**). Sin embargo, la activación de las células endoteliales conlleva grandes cambios fisiológicos, tales como el aumento del flujo sanguíneo y una mayor permeabilidad del endotelio, junto con el aumento de expresión de moléculas de adhesión y la liberación de distintos factores pro-inflamatorios ²⁰, que activan a las células del sistema inmune y promueven el reclutamiento de células al foco infeccioso. En este aspecto se puede destacar la liberación de la quimioquina CXCL8 (IL-8), capaz de atraer a los PMN, y el aumento de expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, PSGL-1, E- y P- Selectina, que interactúan con los PMN para permitir su pasaje a través del endotelio ²¹.

En contraparte, como respuesta a los factores liberados por el endotelio activado y la presencia de factores pro-inflamatorios, los PMN se activan y no sólo aumentan la expresión de integrinas como Mac-1 (CD11b/CD18) sino que también estas integrinas, al igual que la integrina LFA-1, cambian su conformación aumentando su afinidad por las moléculas de adhesión expresadas sobre la superficie de las células endoteliales (como ICAM-1), generando interacciones fuertes, aunque reversibles, en lo que se denomina *adhesión estable*. Luego, en el proceso conocido como *diapédesis* o trans migración, los PMN atraviesan el endotelio pasando entre las células endoteliales y la membrana basal ²¹. Finalmente, los PMN *migran por el tejido* siguiendo el gradiente de concentración de quimioquinas hasta llegar al foco infeccioso, donde despliegan sus *respuestas microbidas*.

En el **Esquema 1** podemos ver un resumen de este proceso con algunas moléculas y fenómenos relevantes. Se encuentran representados los distintos

momentos mencionados en este apartado. Con respecto a la respuesta microbicida, que llevará a la contención o erradicación del patógeno, en un escenario ideal, cabe mencionar que una vez en contacto con los patógenos en el foco infeccioso, el PMN también es capaz de fagocitarlos, activarse aún más y desplegar diversos mecanismos microbicidas intracelulares, como la producción de ROS y la fusión de gránulos con el fagosoma, y extracelulares, como la degranulación y la formación de NETs. Detalles de estos mecanismos microbicidas son abordados en los próximos apartados.



Esquema 1. Respuesta convencional de un PMN. En el esquema se observa un resumen del proceso de extravasación, con los pasos enumerados de manera cronológica y tal como se mencionan en el apartado 2.2, junto con las respuestas microbicidas del PMN. Se destacan células y componentes relevantes, así como moléculas involucradas en cada paso. Adaptado de *The neutrophil*², creado en <https://BioRender.com>

2.3 Mecanismos microbicidas del PMN

Como ya mencionamos, una vez que los PMN reconocen al patógeno se ponen en marcha distintos mecanismos que van a tener como objetivo mediar su muerte. Estos mecanismos microbicidas del PMN pueden ser divididos en los que tienen su acción a nivel intracelular, una vez que el PMN internalizó al patógeno, o directamente a nivel extracelular ¹³.

En primer lugar, tanto para mediar la destrucción del patógeno intracelularmente, así como también para dar lugar a la activación del PMN y gatillar las respuestas extracelulares, es necesario que el PMN reconozca, capture e internalice al patógeno en cuestión, en un proceso denominado fagocitosis.

2.3.1 Fagocitosis

Los PMN, como toda célula de la inmunidad innata, poseen receptores capaces de reconocer a los patógenos llamados Receptores de Reconocimiento de Patrones (RRPs), junto con receptores del complemento (CRs) y receptores que reconocen la fracción constante de los anticuerpos (RFc). Mientras que algunos de estos receptores dan lugar a la activación celular y la producción de citoquinas (típicamente los TLR), otros receptores, como los CLR, CRs y RFc, dan lugar a la internalización del patógeno. Este proceso se denomina fagocitosis, donde el patógeno se introduce a la célula en una vesícula denominada fagosoma ²². Este proceso ocurre dado que, luego de la interacción con el patógeno, se dispara una cascada de señalización intracelular que conduce al remodelado del citoesqueleto, lo cual genera invaginaciones en la membrana plasmática que permiten fagocitar al patógeno ²³.

Una vez fagocitado el microorganismo, ocurren diversos procesos que modifican la composición interna del fagosoma, generando un microambiente hostil para el microorganismo que dará lugar a su posterior muerte. En algunos tipos celulares puede llamarse “maduración del fagosoma” a este proceso ¹³. En los PMN no se encuentra definido de esa forma, pero se conocen mecanismos que ocurren secuencialmente en el tiempo y modifican el medio interno del

fagosoma. Podemos resumir estos mecanismos de muerte intracelular en dos procesos: el ensamblado de la enzima NADPH oxidasa (NOX) y la fusión de los gránulos del PMN con el fagosoma ²⁴.

2.3.2 Mecanismos de muerte intracelular: producción de especies reactivas del oxígeno y acción de proteínas antimicrobianas

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) es posible gracias a la presencia en los PMN de un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa o NOX, el cual está formado por distintas sub-unidades. Estas sub-unidades se encuentran separadas cuando la célula está en reposo, formando parte de la membrana plasmática, como gp91^{phox} y p22^{phox} (juntas forman el flavocitocromo b₅₅₈) o encontrándose en el citoplasma, como p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y Rac2 ²⁵. Sin embargo, frente a señales de activación del PMN, el componente p22^{phox} media el anclaje de las subunidades citosólicas, previamente fosforiladas (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}) o activadas (GTP-Rac2), al flavocitocromo b₅₅₈ ²⁶. Este ensamblado de las sub-unidades de la NOX, principalmente sobre el fagosoma, pero también sobre la membrana plasmática, se lo conoce como estallido respiratorio y da lugar a la producción de ROS. Entre ellos, podemos mencionar al anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales de hidroxilo (-OH) y ácido hipocloroso (HClO) ^{27,28}.

El anión superóxido rápidamente da origen al H₂O₂, por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), aunque también se ha descrito que puede unirse al óxido nítrico (NO), por acción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOS), para formar peroxinitrito (ONOO⁻), un intermediario altamente reactivo. En particular, el ácido hipocloroso (HOCl), un potente halogenante de aminas, se origina gracias a la acción de la enzima mieloperoxidasa (MPO) a partir del H₂O₂ y el cloro (Cl⁻) ^{24,29}. En definitiva, la producción de ROS en los fagosomas cumple su función microbicida oxidando componentes críticos de lípidos y proteínas microbianas. Sin embargo, también se encuentran en el citosol, donde pueden participar como señalizadores en distintas vías, como la activación de las NETs (ver sección 2.3.3.1), o modificar la función de componentes celulares tales como proteínas y lípidos, al alterar el estado de reducción de la célula. A su vez, pueden tener un efecto paracrino sobre otras

células, como las endoteliales, en las que inducen la activación de fosfolipasa D (*phospholipase D*, PLD), para producir ácido fosfatídico y subsecuentemente DAG.

El ya descrito rol de la enzima MPO dentro de los fagosomas, potenciando el efecto del ROS al originar especies reactivas aún más tóxicas, pone de manifiesto el otro mecanismo de muerte intracelular: la fusión de los gránulos del PMN con los fagosomas ³⁰.

Los PMN, también conocidos como granulocitos, poseen cuatro tipos de gránulos descritos hasta el momento: primarios o azurófilos, secundarios o específicos, terciarios y vesículas secretorias ³¹. La heterogeneidad que presentan los gránulos del PMN, tanto en composición interna como en sus componentes de membrana, puede explicarse por la expresión diferencial de proteínas a lo largo de la maduración de los PMN en la médula ósea ³², lo cual sugiere que la presencia de las distintas proteínas en los gránulos se debe a una cuestión temporal de expresión, junto con una sutil regulación de la expresión génica ^{33,34}.

En la fisiología del PMN, podemos asociar cada uno de los tipos de gránulos a distintas funciones mediadas por los PMN ³⁵. En el **Esquema 2** se presenta el conjunto de los gránulos presentes en los PMN, con algunas de sus características (moléculas de membrana y contenido), así como algunas vías intracelulares involucradas en su movilización.

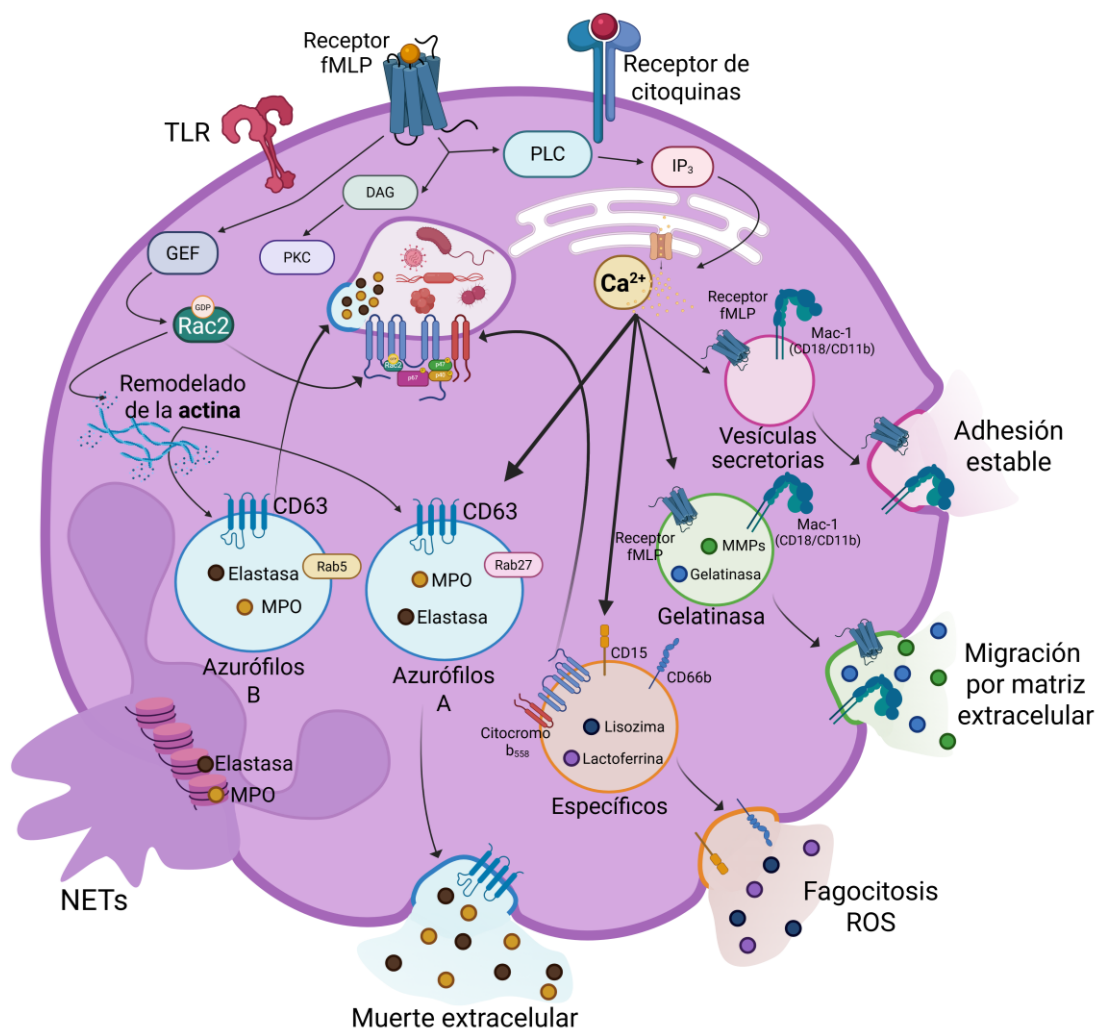
Brevemente, las vesículas secretorias constituyen un reservorio de receptores de membrana asociados a las primeras etapas de activación de los PMN en la respuesta inflamatoria. En particular, poseen en su membrana distintas integrinas involucradas en la adhesión al endotelio, como la molécula CD18/CD11b (Mac-1), y receptores relevantes para su activación, como el receptor para fMLP, mientras no generan la liberación al medio extracelular de proteínas granulares potencialmente dañinas para los tejidos, dado que en su interior contienen albúmina mayoritariamente ³⁶.

Los gránulos terciarios se caracterizan por la presencia de gelatinasa y distintas metaloproteasas en su interior, junto con moléculas de adhesión en su membrana, por lo que su función se puede asociar a la migración de los PMN a través de la matriz extracelular, durante su recorrido hacia el foco infeccioso.

Los gránulos secundarios o específicos poseen en su interior mediadores antimicrobianos tales como lactoferrina y lisozima, entre otros. Además, en su membrana cuentan con una de las sub-unidades de la NOX, facilitando así la producción de ROS, y CD15, molécula que se vio involucrada en migración y fagocitosis. A pesar de movilizarse con más dificultad que los dos tipos de gránulos ya mencionados, los fenómenos conocidos involucrados en su movilización son compartidos por los tres tipos de gránulos mencionados. Este proceso involucra la activación de la fosfolipasa C (PLC) con la consecuente generación de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), provocando un aumento de calcio (Ca²⁺) intracitoplasmático. Se propone que los distintos tipos de gránulos difieren en la sensibilidad al Ca²⁺, cuyos niveles dependen de los receptores del PMN que fueron activados, lo cual permite la movilización secuencial de estos tres tipos de gránulos ^{31,37}.

Por último, se encuentran los gránulos primarios o azurófilos. Este tipo de gránulo es el primero en originarse durante la maduración de los PMN en la médula ósea, contiene a los mediadores más tóxicos y su movilización no sólo tiene el mayor umbral, sino que también parecería involucrar procesos distintos a los mencionados. En línea con la hipótesis que asocia la movilización de cada tipo de gránulo con una función de los PMN, la exocitosis de los gránulos azurófilos es iniciada sólo por los niveles más altos de Ca²⁺ intracelular, la cual ocurre por la activación vía diversos receptores, tanto de citoquinas como RRs, capaces de reconocer a los patógenos. Idealmente, esta activación sólo ocurriría en el foco infeccioso ³⁸. Según se describió, su movilización requeriría de la activación de la fosfolipasa D (PLD) y la activación de proteínas G de la familia Rho, como Rac2, con el consecuente remodelado de la actina ^{39,40}. La elastasa (NE) y mieloperoxidasa (MPO) son dos de los principales componentes microbicidas presentes en estos gránulos. La presencia de la proteína CD63 es una característica de la membrana de estos gránulos ³⁴. Además, se ha descrito

cierta heterogeneidad dentro de los gránulos azurófilos, pudiendo diferenciarse un subconjunto de azurófilos cuyo destino sería la membrana plasmática (positivos para Rab27 y Slp1/JFC1) y otro que se dirigiría hacia los fagosomas (negativos para Rab27 y Slp1/JFC1) ^{41,42}. Fundamentalmente, la fusión de los gránulos azurófilos con los fagosomas constituye un importante mecanismo microbicida intracelular. Una clara evidencia de esto se obtuvo al estudiar ratones mutantes para proteasas presentes en los gránulos azurófilos, como la elastasa, determinando su relevancia para la muerte intracelular de bacterias Gram-negativas ^{43,44}. En particular, algunos autores han postulado que las serinas proteasas presentes en los gránulos azurófilos son los principales agentes mediadores de la muerte intracelular, en lugar del ROS ⁴⁵. Más aún, los gránulos azurófilos no sólo son importantes mediadores de la muerte intracelular, sino que también son protagonistas en los mecanismos de muerte extracelular.



movilización. En respuesta a diversos estímulos, como citoquinas, péptidos microbianos (receptor fMLP) o PAMPs (TLR), se induce la liberación de Ca^{2+} . La concentración de Ca^{2+} intracelular requerida para la movilización es distinta para cada gránulo, lo cual se representa con el grosor de la flecha. Esto permite una jerarquía de movilización, la cual acompaña las funciones del PMN involucradas en su recorrido hacia el foco infeccioso (ver **Esquema 1**). A medida que el PMN se aproxima al foco infeccioso aumenta la intensidad del estímulo y así los niveles de Ca^{2+} intracelulares. Para la movilización de los gránulos azurófilos, la activación de Rac2, con su consecuente remodelación de la actina, también sería necesaria. Se muestran los dos subsets propuestos de gránulos azurófilos, siendo A los que se dirigen a la membrana plasmática y B aquellos que se fusionan con el fagosoma. Adaptado de *Mechanisms of degranulation in neutrophils* ³⁰, creado en <https://BioRender.com>

2.3.3 Mecanismos de muerte extracelular: liberación de gránulos y formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

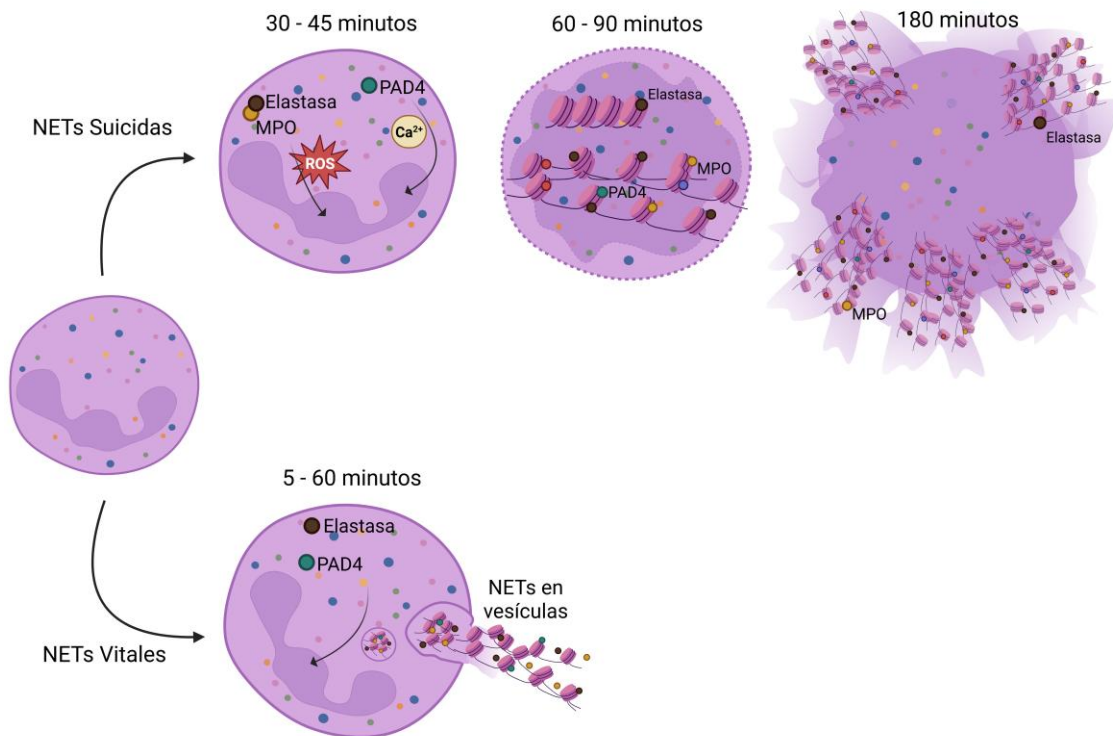
En paralelo a lo descrito anteriormente, el reconocimiento de los patógenos con la consecuente activación del PMN, junto con mediadores originados durante la respuesta microbicida temprana (como la producción de ROS), también constituyen parte de los mecanismos de muerte extracelular del PMN.

Sumado al rol intracelular de los gránulos azurófilos, es necesario también destacar su movilización hacia la membrana plasmática. En este proceso, que puede ser evidenciado por la expresión de CD63 en la membrana del PMN, todo el potencial microbicida, que involucra serin proteasas como la elastasa además de defensinas, catepsina G, proteinasa 3 y MPO, es liberado al medio extracelular ⁴⁶. Como ya fue dicho, un sub-set de estos gránulos son los últimos en movilizarse frente a la activación del PMN, siendo un fenómeno que puede observarse alrededor de las dos horas luego de enfrentarse a un estímulo *in vitro* ⁴⁷. Al igual que en el interior de los fagosomas, el microambiente que generan los PMN en el medio extracelular comienza a ser hostil para la supervivencia del patógeno.

Por otro lado, en el año 2004 fue caracterizado un nuevo mecanismo a través del cual los PMN son capaces de eliminar microorganismos extracelularmente: la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés) ^{3,48,49}, definido como un entramado de cromatina descondensada, unida por carga eléctrica a proteínas de los gránulos, liberado al espacio extracelular ⁵⁰. Demostraron que las NETs carecían de membrana celular y poseían proteínas presentes en los gránulos primarios y secundarios,

histonas y ADN, pero no otras proteínas citoplasmáticas específicas de los PMN. En ese primer trabajo utilizaron al estímulo químico forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) ⁵¹ como principal inductor de la formación de NETs, pero también evidenciaron las NETs en presencia de IL-8, LPS y las bacterias *Salmonella typhimurium* (Gram-negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Encontraron a las bacterias atrapadas en las NETs, así como sus factores de virulencia degradados por proteasas presentes en la red de cromatina, como es la elastasa. Además, se describió la pérdida de viabilidad de las bacterias. Los autores propusieron que este mecanismo podría no sólo evitar la diseminación de los patógenos presentes en el foco infeccioso sino también mediar su contención, a través de generar un microambiente con alta concentración de moléculas con acción antimicrobiana. A partir de este primer reporte, una gran cantidad de trabajos validaron los resultados y demostraron distintos mecanismos involucrados en la formación de NETs, así como nuevos estímulos y contextos ⁵².

Actualmente se conocen una variedad de estímulos capaces de inducir la formación de NETs y, además, que los procesos intracelulares involucrados y los tiempos de estímulo no son siempre los mismos. Esto abre la puerta a una posible clasificación de las NETs, que también dependerá de la subjetividad de los autores. Una de las principales diferencias entre los estímulos capaces de inducir la formación de NETs está en la integridad y viabilidad del PMN. En este sentido, está aceptado clasificar las NETs según si el PMN pierde su integridad de membrana, dando lugar así a las NETs suicidas o líticas, por un lado, y a las NETs vitales o no líticas, por otro lado ⁵³. En el **Esquema 3** se presentan los dos tipos de NETs propuestos junto con algunas de sus características principales. A su vez, también ha sido considerado el requerimiento de la enzima NOX y la consecuente producción de ROS, dando lugar a las NETs NOX-dependientes y las NOX-independientes. Sin embargo, esta característica es compartida por estímulos inductores tanto de NETs suicidas como vitales ⁵⁴⁻⁵⁶.



Esquema 3. Clasificación de la formación de NETs. Según la viabilidad del PMN se pueden dividir las NETs en suicidas o vitales. Las NETs suicidas pueden involucrar la producción de ROS, así como también originarse de manera independiente a la producción de ROS, donde el Ca^{2+} sería relevante. En ambos casos, la elastasa y PAD4 migran al núcleo, se observa descondensación de la cromatina y pérdida de la integridad de la membrana nuclear y plasmática. Finalmente, se libera la cromatina junto con diversas proteínas, causando la muerte del PMN. Para las NETs vitales, la elastasa y PAD4 también migran al núcleo, pero hay una descondensación parcial de la cromatina y las NETs son liberadas por vía vesicular. Se conserva la viabilidad del PMN y puede seguir realizando funciones como quimiotaxis y fagocitosis. Adaptado de *Neutrophil extracellular traps in immunity and disease* ⁵⁷, creado en <https://BioRender.com>

2.3.3.1 NETs suicidas o líticas

Este tipo de NETs fue el primero en ser descrito y se determinó que implicaba la muerte del PMN a través de un mecanismo distinto a la apoptosis y necrosis ⁴⁸. El proceso comienza con la activación de receptores que gatillan un programa que se completa a las 3-4 horas post estímulo e implica distintos fenómenos: producción de ROS, descondensación de la cromatina, rearrreglos en el citoesqueleto, desintegración de la membrana nuclear y fusión de la cromatina con proteínas antimicrobianas y permabilización de la membrana plasmática ^{58,59}.

La producción de ROS juega un papel central en la formación de NETs inducidas por PMA y otros estímulos que fueron utilizados en los primeros

trabajos (IL-8 y bacterias). Su relevancia fue confirmada en numerosas ocasiones, dado que tanto en presencia de inhibidores de la enzima NOX, así como en PMN de pacientes con mutaciones en dicha enzima, no se observan NETs en respuesta a PMA. Se dice que estos estímulos, entonces, inducen NETs NOX-dependientes ^{60,61}.

Está bien descrito que el PMA es un fuerte inductor de la proteína kinasa C (PKC) ⁵¹. En línea con esto, se ha reportado que es necesaria la señalización via Raf-MEK-ERK para la formación de NETs, para dar lugar a la fosforilación de p47^{PHOX}, el ensamblado de la NOX y así la producción de ROS. Además, en la estimulación con PMA, esta misma vía de señalización también incrementa la expresión de Mcl-1, una proteína anti-apoptótica ⁶².

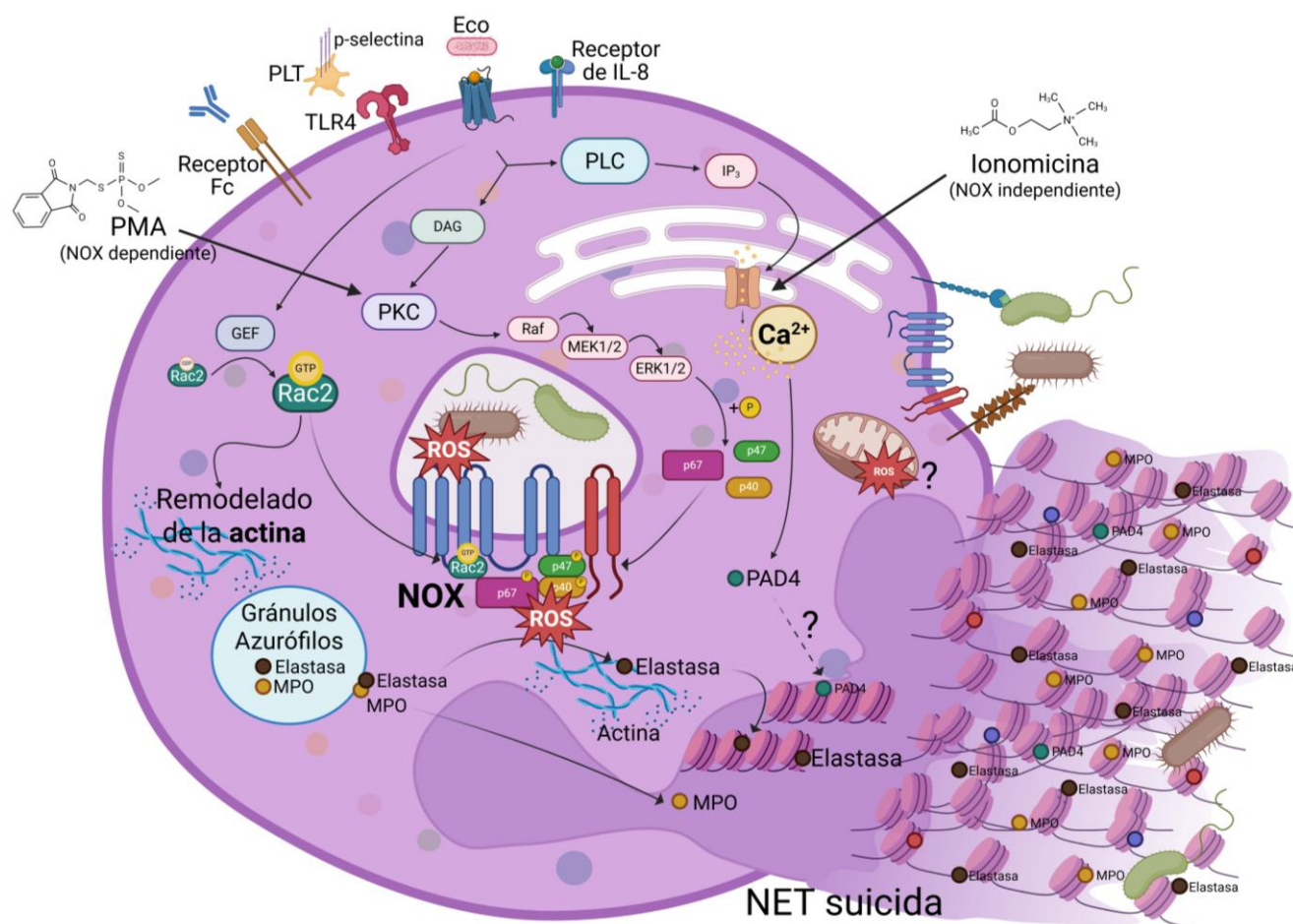
La función reportada más importante mediada por la producción de ROS, en el contexto de la formación de NETs, es la migración de la elastasa al núcleo. En el 2014, Metzler *et al.* demostraron que la activación de la NOX, con la consecuente producción de ROS, induce la activación y liberación de la elastasa, desde los gránulos azurófilos hacia el citosol. Allí se une a la actina del citoesqueleto y es necesaria la actividad de la propia elastasa para translocar finalmente hacia el núcleo. Una vez en el núcleo, la elastasa cliva parcialmente las histonas provocando la descondensación de la cromatina. La enzima MPO también alcanza el núcleo, posteriormente a la llegada de la elastasa, y se potencia la descondensación de la cromatina ⁶³.

Este punto en particular durante el proceso de formación de NETs fue definido como un punto de no retorno ⁶⁴. En ese trabajo, los autores postulan que diversos procesos biológicos ocurren durante los primeros 60-80 minutos, representando un momento donde los inhibidores farmacológicos pueden tener un efecto. Sin embargo, una vez gatillada la descondensación de la cromatina, evidenciada mediante los cambios morfológicos del núcleo o la llegada de la elastasa, la misma entropía lleva a la ruptura de la membrana nuclear y luego plasmática. Las evidencias que llevaron a proponer este modelo fueron los resultados que obtuvieron utilizando inhibidores o estabilizadores del citoesqueleto. Primero, observaron que la dinámica del citoesqueleto es necesaria para la formación de NETs ya que todas las drogas afectaron su

inducción por PMA. Más aún, estas drogas sólo inhibieron la formación de NETs si eran agregadas hasta 45 minutos post PMA. Más allá de distintas evidencias del rol del citoesqueleto en la formación de NETs ^{63,65,66}, Sprenkeler *et al* confirmaron que la inhibición de la dinámica de F-actina afecta las NETs inducidas por diversos estímulos, evidenciado por la falta de elastasa en el núcleo ⁶⁷. En línea con la necesidad de un citoesqueleto activo para la formación de NETs, fue reportado que PMN deficientes en Rac2, GTPasa de la familia Rho, son incapaces de liberar NETs ^{68,69}. A pesar de no conocerse los mecanismos en detalle, Rac2 forma parte de la NOX, permitiendo la producción de ROS, así como también es necesario para el remodelado de la actina y el funcionamiento del citoesqueleto ^{39,40}.

Otro factor implicado en la formación de NETs es la proteína arginina deiminasa tipo 4 (PAD4) ⁷⁰. PAD4 media la conversión de arginina a citrulina en las histonas, lo cual reduce su carga positiva y así también reduce la interacción electrostática de las histonas con el ADN ⁷¹. Se encuentra descrito que esta enzima requiere la unión a iones calcio para adoptar una conformación catalíticamente activa ⁷². En línea con esto, se ha descrito que los ionóforos de calcio, como ionomicina, son capaces de inducir la formación de NETs vía PAD4, mientras que se observó que PAD4 no es clave en las NETs inducidas por PMA. De manera interesante, se descubrió que estos estímulos relacionados con la dinámica del calcio son capaces de inducir NETs aún en presencia de inhibidores de la enzima NOX, dando lugar a lo que se denominó formación de NETs NOX-independientes ⁷³. Sin embargo, cabe destacar que el mecanismo propuesto para la formación de NETs inducidas por ionomicina depende de la señalización vía AKT y la formación de ROS mitocondrial, inducido por los niveles de Ca²⁺. Además, se observó que la citrulinación de histonas no alcanza para inducir la descondensación del ADN, revelando un rol importante de la elastasa también en este tipo de NETs ^{53,60}.

En el **Esquema 4** se presentan los estímulos y las vías involucradas durante la formación de NETs suicidas, recopilando todo lo mencionado en esta sección.



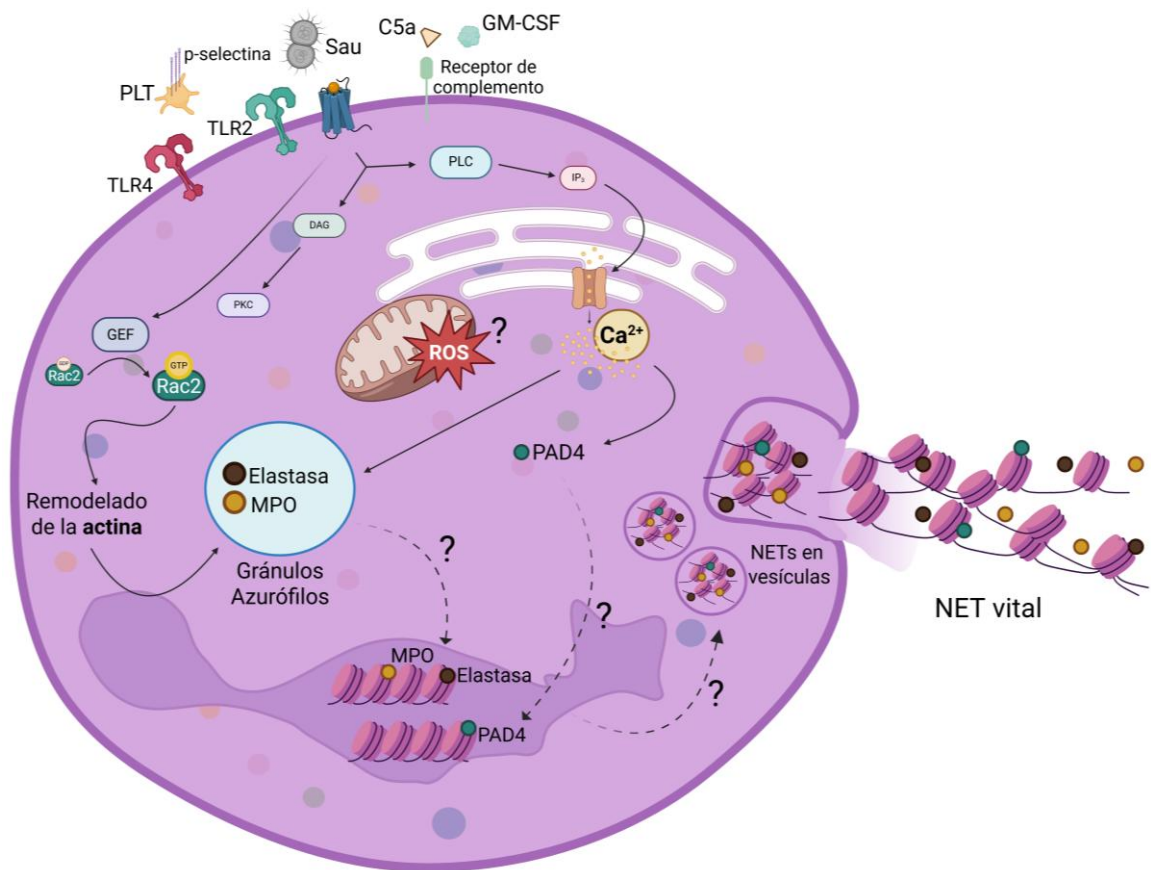
Esquema 4. Estímulos y vías intracelulares involucrados en la formación de NETs suicidas. La formación de NETs NOX-dependientes fue estudiada principalmente a través de la inducción con PMA, activador de PKC por su similitud con DAG. La posterior activación de Raf-MEK-ERK, capaces de fosforilar sub-unidades citosólicas de la NOX y permitir su ensamblado, da lugar a la producción de ROS. Esto favorece la migración de la Elastasa desde los gránulos azurófilos hacia el núcleo, ayudada por la actina. La Elastasa en el núcleo, junto con la MPO que llega posteriormente, favorece la descondensación de la cromatina que gatilla la liberación de la NET. Por otro lado, ionóforos de calcio como ionomicina, inducen la formación de NETs NOX-independientes. En este caso, la liberación de Ca²⁺ permitiría la activación de PAD4, su llegada al núcleo y así la descondensación de la cromatina, de manera independiente de la activación de la NOX, aunque no está claro cómo PAD4 alcanza el núcleo. Se muestran también diversos estímulos capaces de inducir la formación de NETs suicidas, como las plaquetas (PLT) activadas, anticuerpos, la bacteria *Escherichia coli* (Eco) y citoquinas como IL-8. En estos casos no se conocen en profundidad los mecanismos involucrados. Por último, también es necesaria la polimerización de actina y la activación de la GTPasa Rac 2 como mediadores claves para la formación de NETs suicidas. Las flechas punteadas representan mecanismos que aún no fueron descritos. Adaptado de *An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease*⁷⁴, creado en <https://BioRender.com>

2.3.3.2 NETs vitales o no líticas

Pocos años después, en estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, fue demostrado que la formación de NETs inducidas por ciertos estímulos podía ocurrir completamente independiente de la lisis celular y, en consecuencia, sin pérdida de la viabilidad ^{75,76}. En contraposición a las NETs suicidas, observaron que los PMN son capaces de liberar ADN junto con proteínas granulares, como elastasa y MPO, a tiempos más rápidos que lo pensado, pudiendo determinarlas entre los 5 y 60 minutos post estímulo ⁷⁷. Se postula que esta rápida liberación de ADN podría ocurrir vía vesículas, sin perderse la integridad de membranas.

Con respecto a su mecanismo, se encontró que la activación de la enzima NOX no era necesaria para la formación de NETs vitales y que los PMN todavía eran capaces de migrar y fagocitar ⁷⁸. Se vio también la necesidad de receptores específicos, como los TLRs de membrana y receptores del complemento ⁷⁹. Asimismo, se encontró que PMN humanos en presencia de GM-CSF y luego C5a por poco tiempo, en lugar de liberar NETs con ADN nuclear vía vesículas, son capaces de liberar NETs con ADN mitocondrial, en un mecanismo dependiente de la producción de ROS ⁸⁰. Se observó que la elastasa también migra al núcleo durante las NETs vitales, así como PAD4 es activada y se induce cierta descondensación de la cromatina ⁷⁴. Sin embargo, en lugar de romperse la membrana nuclear y plasmática, la cromatina decorada con proteínas es secretada vía vesículas, permitiendo a los PMN conservar su viabilidad y continuar con algunas funciones como la fagocitosis.

En el **Esquema 5** se presenta un resumen de los componentes involucrados en la formación de NETs vitales. En este caso, entendiendo que aún falta mucho por dilucidar en cuanto a los mecanismos intracelulares, se incluyen vías conocidas a partir de los estímulos y receptores involucrados.



Esquema 5. Estímulos y vías intracelulares involucrados en la formación de NETs vitales. Se muestran los principales estímulos capaces de inducir la formación de NETs vitales con sus correspondientes receptores. A pesar de no conocerse los mecanismos que median su llegada al núcleo, se reportó la presencia de PAD4 y elastasa, que mediarían la descondensación parcial para la posterior liberación de NETs en vesículas. A su vez, se incluyen flechas con línea punteada que representan interrogantes, dado que no fue descrito aún cómo ocurren esos procesos. Adaptado de *An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease*⁷⁴, creado en <https://BioRender.com>

La atención en el estudio de la formación de NETs se está desplazando hacia qué vías de señalización son relevantes y cómo pueden manipularse estas vías. Sin embargo, considerando el rol de las NETs en un gran número de situaciones, sigue sin estar claro en qué patologías o situaciones puede ser beneficioso potenciar las NETs y cuándo debe ser inhibida. Además, tampoco hay certezas acerca de cómo ciertos patógenos logran evitar la inducción de NETs o prevenir su acción. Existe evidencia para proponer la presencia de distintos mecanismos involucrados en la formación de NETs, así como también su relevancia en la respuesta del PMN. De todos modos, aún quedan importantes preguntas por responder para lograr entender los fenómenos que gobiernan este complejo mecanismo de muerte extracelular.

2.4 Evasión de la respuesta microbicida

Como ya fue dicho, en humanos, aproximadamente 100.000 millones de PMN entran y salen de la circulación sanguínea cada día ⁸¹. Sabemos que la neutropenia (disminución de PMN) adquirida o heredada, así como la disfunción de los PMN da lugar a infecciones recurrentes por bacterias y hongos. Esto subraya la importancia de los PMN como primera línea de defensa en la inmunidad innata ⁸². En este sentido, es lógico pensar que, a pesar de la eficiencia de los PMN para eliminar la mayoría de los patógenos, algunos patógenos hayan desarrollado mecanismos para evadir su eliminación por parte de estos leucocitos ⁸³.

Para cada uno de los pasos involucrados durante la respuesta del PMN han sido descritas estrategias de evasión mediadas por patógenos. De manera general, podemos mencionar que existen reportados mecanismos para evitar la llegada de los PMN ⁸⁴, la fagocitosis y la consecuente muerte intracelular, la formación de NETs o bien también la inducción de la muerte del PMN (*Streptococcus pyogenes* ^{85,86}, *Clostridium perfringens* ⁸⁷, *Staphylococcus aureus* ⁸⁸ y *Pseudomonas aeruginosa* ⁸⁹).

Entre los mecanismos descritos para evitar la fagocitosis se encontró la presencia de componentes de la pared o cápsula microbiana capaces de impedir el reconocimiento ⁹⁰ o interferir en la opsonización, por ejemplo, al afectar la activación del complemento ⁹¹. Además, se reportó la inhibición del citoesqueleto de actina o componentes celulares necesarios para llevar a cabo la fagocitosis. Con respecto a este último mecanismo, es interesante destacar la utilización de un sistema de secreción tipo 3 (T3SS) por parte de distintos patógenos Gram-negativos para introducir proteínas efectoras en los PMN. Entre las moléculas efectoras de estos T3SS se encontraron proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) como YopE (*Yersinia spp.*), SptP (*Salmonella enterica*) y ExoS (*P. aeruginosa*), las cuales son capaces de dirigirse a pequeñas proteínas G de la familia RhoA, provocando la alteración del citoesqueleto de actina e inhibiendo así activamente la fagocitosis. Otra proteína efectora reportada, YopH, bloquea la señalización Ca²⁺ temprana en los PMN y perjudica la fagocitosis ⁹².

Existen otros patógenos que, a pesar de ser fagocitados, evaden la muerte intracelular mediante mecanismos que evitan la producción de ROS. Una estrategia reportada es el impacto sobre el ensamblado de la NOX, evitando la fusión de alguno de sus componentes como el flavocitocromo b₅₅₈^{93,94}, p47^{phox} o p67^{phox}⁹⁵. También se reportó que YopE, liberada vía un T3SS, es capaz de interferir con Rac2, una GTPasa que constituye una de las sub-unidades de la NOX⁹⁶. A su vez, ExoS también es capaz de inhibir la señalización vía PI3K y afectar así el ensamblado de la NOX⁹⁷. En cuanto a la muerte intracelular independiente del oxígeno, mediada por los gránulos de los PMN, el principal mecanismo de resistencia reportado tiene como blanco a las serin proteasas, como la elastasa, y consiste en la modificación de su sustrato, así como también la producción de inhibidores específicos⁹⁸. Sin embargo, también hay reportes de patógenos que afectan la movilización de los gránulos tanto hacia el fagosoma como hacia la membrana plasmática^{99,100}.

Por otro lado, focalizando en los mecanismos de muerte extracelular, así como se ha descrito un efecto de distintos patógenos sobre la degranulación, también existe una gran variedad de trabajos que evidencian la presencia de mecanismos de evasión de la formación de NETs^{101,102}. La formación de NETs es un proceso complejo, que puede involucrar distintas vías, moléculas y pasos dependiendo del estímulo y el contexto. En este sentido, es lógico pensar que algunos de los mecanismos de evasión ya descritos también tendrán un efecto negativo sobre las NETs, dado que impactan sobre algún aspecto clave en su vía de inducción, como puede ser la producción de ROS, la función de la elastasa o el citoesqueleto. Más allá de un reporte donde se observó un impacto directo sobre PAD4¹⁰³, el principal mecanismo de evasión reportado es la secreción de enzimas capaces de degradar el ADN que compone las NETs, una vez liberadas al medio extracelular^{104–111}. A su vez, también se reportó la liberación de proteasas que afectan la capacidad microbicida de las NETs^{112,113}.

Una eficiente respuesta inmune necesita de los PMN para erradicar patógenos, mientras que estos deben frenar el ataque de los PMN para persistir y colonizar. Este constante enfrentamiento impulsa, al mismo tiempo, la evolución de los mecanismos de evasión microbianos y también de la respuesta

inmune. Por lo tanto, el estudio y entendimiento de los diversos mecanismos de evasión de la respuesta de los PMN por parte de patógenos nos puede llevar a comprender aspectos esenciales de la inmunidad innata. Además, la descripción de estos mismos mecanismos tiene el potencial de inspirar nuevas terapias, tanto antimicrobianas como moduladoras de la respuesta inflamatoria mediada por PMN.

3. *Klebsiella pneumoniae*

3.1 Generalidades

El género *Klebsiella* se encuentra dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. En particular, la especie *Klebsiella pneumoniae* fue aislada a partir de pulmones de pacientes y su primera referencia histórica es en 1882, como un causante de la “neumonía de Friedlander”. Fue llamada *Hyalococcus pneumoniae* por éste, posteriormente *Bacillus pneumoniae* y finalmente *Klebsiella pneumoniae* ¹¹⁴. Cabe destacar que, previo a la era de los antimicrobianos, la mortalidad por neumonía de Friedlander se estimaba en alrededor de 80% y existe al menos un reporte de un 54% de mortalidad, incluso en pacientes tratados con estreptomycin y cloranfenicol ¹¹⁵.

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram-negativo no móvil muy ubicuo, ya que se puede aislar comúnmente en el medio ambiente, agua, plantas, residuos, así como también puede colonizar superficies mucosas, no solo en humanos, sino también en animales ^{116,117}.

Históricamente, *Klebsiella pneumoniae* fue considerado un patógeno oportunista, siendo uno de los principales responsables de infecciones intrahospitalarias en todo el mundo ¹¹⁸. Sin embargo, es necesario destacar que es una definición relativa. En 1986 en Taiwán se reportaron siete casos de infecciones adquiridas en la comunidad por una cepa invasiva de *Klebsiella pneumoniae*, causando abscesos hepáticos. Desde aquel reporte, las infecciones causadas por cepas de *Klebsiella pneumoniae*, que expresan diversos genes que le confieren gran virulencia y capacidad invasiva, han aumentado constituyendo un grave problema para la salud hoy en día. Se las

conoce como *Klebsiella pneumoniae* hipervirulentas (Kpn Hv) y fenotípicamente se caracterizan por una mayor producción de cápsula e hipermucoviscosidad, aunque no es determinante para la caracterización ¹¹⁹. Por el contrario, el grupo denominado como *Klebsiella pneumoniae* clásicas está constituido por las cepas oportunistas, definidas como no virulentas tanto porque generalmente afectan a personas con sistema inmune deprimido, ancianos, neonatos y personas que permanecen en unidades hospitalarias durante cierto periodo de tiempo, como también por no expresar factores de virulencia ⁶. Sin embargo, este último grupo de *Klebsiella pneumoniae* es el que fácilmente desarrolló diversas estrategias de multirresistencia a los antimicrobianos.

3.2. Multirresistencia a los antimicrobianos

Más allá de las infecciones oportunistas que *Klebsiella pneumoniae* ha causado a lo largo del tiempo, el factor fundamental por el cual ha emergido como un patógeno de relevancia clínica, incluso considerándose desde el 2017 y actualmente en la lista de prioridad crítica ^{4,5}, es la gran facilidad con la que adquiere mecanismos que le confieren resistencia a múltiples antimicrobianos. Algunos trabajos señalan que el aumento de la resistencia a los antimicrobianos es un reflejo de ciertos fenómenos que pueden ser resumidos en: 1- la diseminación epidémica de linajes genéticos multirresistentes de alto riesgo, 2- la adquisición de plásmidos exitosos en términos de propagación y 3- la diseminación de genes de resistencia alojados en transposones fácilmente transferibles ^{120,121}. Debido a que *Klebsiella pneumoniae* porta genes de resistencia en elementos genéticos móviles (como plásmidos y transposones), un aspecto clave en la importancia de su contención es que fácilmente puede diseminar las resistencias a bacterias de igual o distinta especie ¹²²⁻¹²⁴.

Dentro de las distintas estrategias que confieren resistencia a los antimicrobianos, la modificación enzimática de la droga representa uno de los pilares del éxito de *Klebsiella pneumoniae* como microorganismo multirresistente. Las enzimas β -lactamasas son las responsables de la inactivación de los antimicrobianos β -lactámicos mediante hidrólisis, antes de que puedan unirse a las proteínas de unión a la penicilina (*penicillin-binding protein*, PBP), una serie de transpeptidasas esenciales para el proceso de

síntesis del peptidoglicano, constituyente de la pared bacteriana. La unión β -lactámico-PBP es irreversible e inhabilita el sitio de unión de la enzima a su sustrato, deteniendo la síntesis de peptidoglicano y por tanto debilitando la pared, lo cual precipita la muerte bacteriana ¹²⁵.

Klebsiella pneumoniae expresa una gran diversidad de β -lactamasas, cada una de ellas con espectros muy variados. Las primeras descubiertas fueron SHV-1 (de expresión cromosómica) y TEM-1, capaces de hidrolizar penicilina y amoxicilina (aminopenicilinas). Luego, producto de diversas mutaciones, no solo se originaron variantes de las mismas enzimas, sino que además tales mutaciones dieron origen a la ampliación de su espectro de acción, llegando a hidrolizar a otros integrantes de la familia β -lactámica, como cefalosporinas (desde las de primera hasta las de tercera generación) y monobactámicos. Por esta razón, comenzaron a ser denominadas, en su conjunto, como β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) ¹²⁶. Estas enzimas pueden ser inactivadas a su vez por inhibidores, como el ácido clavulánico, el sulbactam, avivactam y el tazobactam. Además de las BLEE, de las cuales existe una inmensa variedad, también se ha descripto que *Klebsiella pneumoniae* puede incorporar genes que codifican enzimas tipo AmpC, típicamente cromosómicas en otros géneros, pero que puede insertarse en elementos genéticos móviles ^{127,128}. Este grupo de enzimas, a diferencia de las BLEE, no son inactivadas por los inhibidores clásicos, sumado a que la expresión de sus genes aumenta en la medida en que la bacteria es más expuesta al antimicrobiano.

Posteriormente, ampliando más aún el espectro de acción de la multirresistencia, surgieron las enzimas carbapenemasas. Estas son β -lactamasas que, además de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y monobactames, tienen acción sobre carbapenemes, los β -lactámicos más potentes disponibles hasta el momento. Los carbapenemes (ertapenem, imipenem, meropenem y doripenem) han sido la opción natural para tratar infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE o AmpC, ya que estas enzimas no logran hidrolizarlos. Las carbapenemasas pueden clasificarse molecularmente según si son serin-carbapenemasas, dado que su actividad hidrolítica requiere de serina en su sitio activo, o metalo-carbapenemasas por

requerir de iones metálicos como cofactores ¹²⁹. Dentro de las carbapenemasas es necesario destacar a la enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC), una serin-carbapenemasa codificada en elementos genéticos móviles, como *bla*_{KPC}. KPC ha sido la carbapenemasa más exitosa en términos de propagación, ya que su presencia se ha descrito en todos los continentes ^{130,131}, desde su descubrimiento reportado en 2001 ¹³².

El éxito de la dispersión mundial del gen *bla*_{KPC} ha sido en gran parte gracias al secuenciotipo 258 (ST258) de *Klebsiella pneumoniae*. El gen *bla*_{KPC} se encuentra alojado en el transposon TN4401, un entorno genético de gran plasticidad y que fácilmente puede ser transferido de forma vertical, así como horizontalmente ^{133–135}.

En este grave contexto de resistencia extrema por parte de las bacterias, aparecieron las polimixinas y la tigeciclina, como “drogas de rescate” o de opción terapéutica. Básicamente, las polimixinas (polimixina B y polimixina E o colistina) son polipéptidos cíclicos catiónicos que desestabilizan la membrana bacteriana, cuya carga fuertemente negativa está dada por el LPS. Esta desestabilización provoca la muerte de la bacteria al generar que la célula estalle, por haber perdido su estructura. No es una droga nueva, ya que ha tenido otros usos desde hace décadas, pero debido a su nefrotoxicidad no es ampliamente usada en humanos. Sin embargo, se ha demostrado cierta efectividad frente a bacterias multirresistentes, como *Klebsiella pneumoniae* ST258 KPC⁺ ¹³⁶. Aun así, las polimixinas no escapan de la constante lucha de las bacterias por evitar a los antimicrobianos. Actualmente se conocen mecanismos de resistencia a las polimixinas, tanto cromosómicos como plasmídicos, que se basan en las modificaciones en el LPS que lo hacen menos susceptibles a la acción los polipéptidos catiónicos ^{137–139}. Aunque las bacterias oportunistas como *Klebsiella pneumoniae* ST258 KPC⁺ pueden no ser peligrosas para personas inmunocompetentes, debe tenerse en cuenta que representan reservorios importantes de genes de multirresistencia. Por lo tanto, es de suma relevancia controlar su diseminación, ya que pueden transmitir estos genes de resistencia a cepas virulentas, volviéndolas extremadamente peligrosas. En este sentido, en

los últimos años ya han sido reportados diversos brotes de cepas de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta y multirresistente en hospitales de China ^{140,141}.

3.3 *Klebsiella pneumoniae* ST258 KPC⁺

El objetivo de este trabajo de tesis es el estudio del impacto en la respuesta inmune de un aislado clínico de *Klebsiella pneumoniae* ST258 KPC⁺, la cual también denominaremos Kp a partir de ahora.

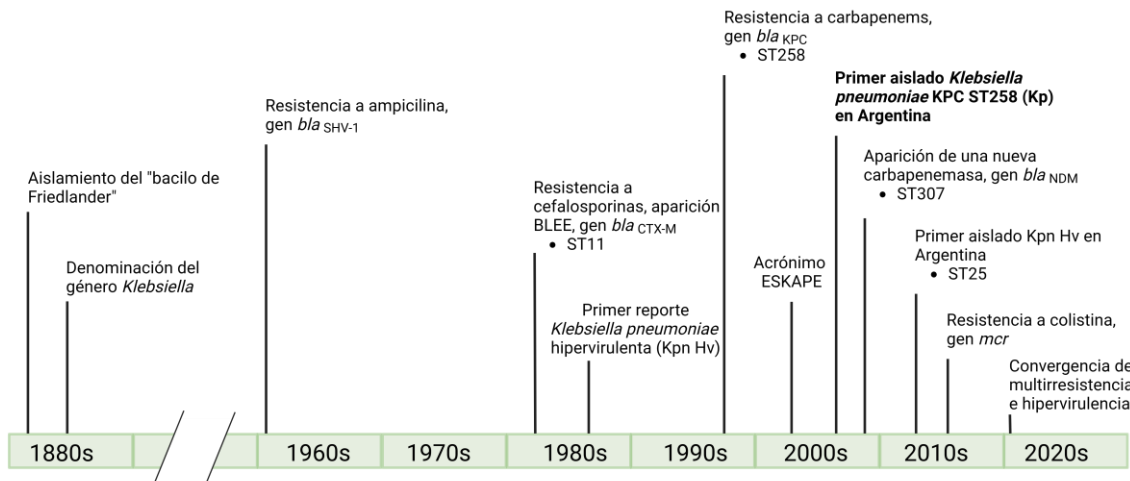
La emergencia de las cepas productoras de carbapenemasas y su amplia distribución mundial ha sido a causa del gran éxito del clon de *Klebsiella pneumoniae* ST258 KPC⁺ en su diseminación, llegando a ser causante de hasta el 68% de los brotes observados a nivel mundial desde su primer aislamiento, en el año 1996 ¹³⁴, y siendo considerado un clon hiper-epidémico ^{142,143}. Es importante destacar que la resistencia de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* ST258 no solo está fuertemente asociada al gen *bla*_{KPC}, sino que además en los plásmidos donde se aloja dicho gen están insertos otros genes que confieren resistencia a antimicrobianos de otras familias, como quinolonas, aminoglicósidos, macrólidos, trimetoprin y sulfonamidas ¹⁴⁴, algunos de los cuales ya fueron mencionados. Todo esto hace que las opciones terapéuticas para este tipo de bacterias sean realmente escasas. En particular, como ya se dijo, la suceptibilidad de estas cepas KPC⁺ está limitada al uso de colistina y tigeciclina. Sin embargo, son preocupantes los trabajos donde la prevalencia de cepas resistentes a estos compuestos se encuentra en aumento ^{145–147}.

Considerando las cepas multirresistentes, y particularmente las productoras de carbapenemasas, se reportaron tasas de letalidad entre 34 y 50% en los pacientes infectados, posterior a las dos semanas de infección ¹⁴⁸. Más aún, en un estudio retrospectivo multinacional, se encontró a *Klebsiella pneumoniae* ST258 KPC⁺ como causante del 70% de las infecciones ¹⁴⁹. En la Argentina, del total de aislamientos hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae* reportados a la Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, hasta el 20% mostraba resistencia a carbapenemes, 7,6% a colistin y 7,8% a tigeciclina, las ultimas opciones de antimicrobianos para tratar la infección ¹⁵⁰.

A nivel local, en el año 2006 se obtuvo el primer aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* ST258 productora de KPC en Argentina ¹⁵¹ y ya para el año 2011 se reportó que dicha cepa fue capaz de expandirse rápidamente en las instituciones hospitalarias del país de forma clonal, principalmente a causa del clon ST258 ⁷ manteniéndose desde entonces como endémico en el país.

No obstante, recientes reportes dan cuenta de la diversidad también existente en el país en cuanto a los clones de *Klebsiella pneumoniae* circulantes. Cejas *et al.* muestra cómo 42% de los aislamientos provenientes de tres hospitales de la ciudad de Buenos Aires son pertenecientes al secuenciotipo ST25, un clon hipermucoso y virulento, relegando al ST258 al segundo lugar, con 26% de las 76 cepas analizadas, seguidas por el ST392 (10.5%) y ST11 (10.5%) ¹⁵². En todo caso, el grupo clonal 258, que incluye tanto al ST258 como al ST11 y ST512, sigue siendo el más predominante a nivel global ⁶. En este sentido, a pesar de la gran cantidad de estudios evolutivos, epidemiológicos e inmunológicos del impacto de los STs de *Klebsiella pneumoniae*, las bases moleculares de la rápida y exitosa diseminación mundial del ST258 continúa siendo un área de investigación activa ¹⁵³.

En el **Esquema 6** se muestra una línea de tiempo donde se reflejan los acontecimientos relacionados a la adquisición de genes de resistencia en *Klebsiella pneumoniae*. A su vez, se reflejan algunos ST relevantes mencionados a lo largo del texto.



Esquema 6. Línea de tiempo de *Klebsiella pneumoniae*. Los eventos reflejados en la línea de tiempo son mencionados en los apartados 3.1, 3.2 y 3.3. Adaptado de *Innate Host Defense against Klebsiella pneumoniae and the Outlook for Development of Immunotherapies* ¹⁵⁴, creado en <https://BioRender.com>

3.4 Respuesta inmune frente a *Klebsiella pneumoniae*

La evidencia publicada durante más de 20 años establece que una respuesta pro-inflamatoria es crucial para la correcta eliminación *in vivo* de *K. pneumoniae* ¹⁵⁵. Por un lado, ratones deficientes en el receptor de TNF α (TNFR1) son más susceptibles a la infección pulmonar ^{156,157}. En línea con estos hallazgos, se reportó que la instilación intratraqueal con CpG o di-GMP cíclico aumenta la producción de TNF α , IL-12 e IFN γ , potenciando la eliminación de la bacteria vía TLR9 y STING ^{158–161}. De manera interesante, todos estos tratamientos resultaron en un aumento del reclutamiento de PMN, monocitos, células NK activadas y linfocitos T y δ al sitio de infección. Sin embargo, incluso a pesar del reclutamiento de PMN durante las infecciones *in vivo* de *K. pneumoniae*, es importante mencionar que la evidencia con respecto al rol de los PMN en la eliminación de *K. pneumoniae in vivo* es controversial: puede favorecer la eliminación ¹⁶², tener un rol deletéreo ¹⁶³ o no contribuir, pero sin perjudicar ¹⁶⁴.

Históricamente se consideró que *K. pneumoniae* es un patógeno sigiloso, incapaz de dar lugar a una respuesta inmune innata ¹⁵³. Sin embargo, con el correr del tiempo fueron apareciendo cada vez más trabajos demostrando que *K. pneumoniae* posee diversos mecanismos para evadir activamente la

respuesta inmune. Poniendo en evidencia el éxito de *K. pneumoniae* en las infecciones, fue reportado que algunas cepas pertenecientes al ST258, el más diseminado a nivel mundial, adaptaron características que les permitieron reclutar células con perfil supresor, estableciendo un entorno anti-inflamatorio que favoreció la persistencia pulmonar ¹⁶⁵.

Uno de los principales factores involucrados en la evasión por parte de *K. pneumoniae* es su cápsula polisacárida (CPS). En particular, es responsable de la evasión al complemento, dado que cepas mutantes en CPS son susceptibles a la muerte por complemento y a la deposición de C3b ^{166,167}. Sin embargo, existen grandes diferencias en la composición de la CPS entre las *K. pneumoniae* y se observó que la protección conferida por la cápsula es más dependiente del grosor del polisacárido, en lugar de la composición química ¹⁶⁸.

La interacción de los PMN con *K. pneumoniae* ha sido estudiada, entendiéndose que el reclutamiento de los PMN a los pulmones es distintivo de las neumonías inducidas por esta bacteria. Distintos estudios *in vitro* mostraron que la presencia de la CPS evita la fagocitosis por parte de los PMN, perjudicando la eliminación bacteriana ¹⁶⁹⁻¹⁷². En este sentido, se ha visto en algunos casos que la utilización de anticuerpos específicos contra la cápsula, o bien de opsoninas, puede revertir la falta de respuesta por parte del PMN ¹⁷³. Sin embargo, otro estudio *in vitro* más reciente utilizando un aislado clínico multirresistente de *K. pneumoniae*, demostró que la bacteria sí es fagocitada efectivamente, pero que logra impedir la acidificación del fagosoma y sobrevive intracelularmente por al menos 2 horas en PMN murinos ¹⁷⁴. Por otro lado, también se observó que la presencia de la porina OmpK36, cuya expresión estaría inhibida en cepas de *K. pneumoniae* multiresistentes a los antibióticos, es capaz de mediar inhibición de la fagocitosis por parte de PMN y macrófagos alveolares ^{175,176}.

En este sentido, es importante mencionar que hay una gran variedad de cepas de *K. pneumoniae* que son utilizadas, observándose entonces distintas respuestas inmunes efectoras. Esto pone de manifiesto lo relevante que es caracterizar cada aislado utilizado, sumado a que cada aislado clínico tendrá su propia evolución y características propias, más allá de las generalidades de la cepa. Una característica clave a tener en cuenta es la presencia de la CPS, ya

que, como ya se dijo, ha sido asociada a la evasión del complemento y la fagocitosis ^{177,178}. Sin embargo, sabemos que la presencia de CPS gruesas se asocia a fenotipos hipermucosos y tanto la composición de la CPS, así como su grosor, puede variar entre cada aislado. Nuevamente, se pone de manifiesto que es relevante la caracterización de la cepa de *Klebsiella pneumoniae* utilizada en cada caso, permitiendo así una mejor comprensión de su interacción con el sistema inmune y evitando aparentes contradicciones.

La inducción de apoptosis en los PMN en el foco infeccioso es uno de los primeros pasos hacia la resolución de la infección, entendiendo que su fagocitosis por parte de macrófagos residentes (proceso también llamado eferocitosis), induce un perfil alternativo, anti-inflamatorio. Se ha visto que en presencia de *Klebsiella pneumoniae*, los PMN tienen una baja expresión de fosfatidilserina, lo cual retrasa la etapa resolutive dado que su alta expresión representa una señal para que el macrófago lo fagocite ¹⁷⁹.

Recientemente fue demostrado que *Klebsiella pneumoniae* es capaz de persistir en PMN murinos ¹⁷⁴, pero su capacidad de sobrevivir en macrófagos había sido reportada previamente ^{180–183}. Sin embargo, Cano *et al* en el 2015 realizó un estudio exhaustivo de este fenómeno, demostrando que *K. pneumoniae* es capaz de persistir hasta 7 horas al menos en macrófagos humanos, en un compartimiento vacuolar intracelular particular, que se desvía del tránsito convencional y no se une con lisosomas. Los factores involucrados en este proceso todavía se desconocen, pero fue demostrado que la CPS no es relevante en este caso. Mutantes de CPS conservan este mecanismo de evasión y, además, vieron que *K. pneumoniae* disminuye la expresión de los genes relacionados a la CPS una vez dentro del macrófago ¹⁸⁴. Focalizando en los macrófagos, población de células residentes de tejido fundamentales en la respuesta anti-bacteriana, existen reportes de la presencia de macrófagos con un perfil M2 en modelos murinos de infección por *K. pneumoniae*. Existen diversos trabajos que demuestran que, al depletar esta población, la eliminación de la bacteria mejora ^{185–187}. En esta línea, también se describió que infecciones *in vivo* de *K. pneumoniae* se caracterizan por niveles elevados de IL-10, citoquina anti-inflamatoria característica de macrófagos M2 ^{188,189}.

Finalmente, también hay estudios en células no inmunes, pero relevantes en los primeros momentos de la respuesta anti-bacteriana. Utilizando líneas celulares de epitelio pulmonar *in vitro*, también se observó que *Klebsiella pneumoniae* es capaz de suprimir la señalización vía NF-κB, con la consecuente falta de liberación de IL-8 ¹⁹⁰. En particular, este mecanismo depende de la activación de NOD1 e involucra la inhibición de la Rho GTPasa Rac1 ¹⁹¹.

4. Resultados previos del grupo

Hace algunos años nuestro laboratorio se encuentra estudiando la interacción de los PMN con *Klebsiella pneumoniae*. En particular, la investigación siempre se encontró centrada en un aislamiento clínico local, caracterizado como KPC⁺ y del ST258, al cual denominamos Kp. No presenta un fenotipo hipermucoso, tampoco resistencia a la fagocitosis y mostró ser susceptible a la muerte mediada por complemento, tres características que evidenciarían la ausencia de una gruesa CPS ^{9,192}.

Previamente hemos reportado que Kp es incapaz de gatillar la producción de ROS, a pesar de inducir la expresión de marcadores de activación, como CD11b, y ser fagocitada de manera eficiente, en comparación con otra enterobacteria capaz de activar a los PMN ⁹. Más aún, observamos que un extracto de Kp enriquecido en componentes de membrana inhibe la producción de ROS inducida por fMLP. Al investigar las moléculas de membrana involucradas en este fenómeno, la región polisacárida del LPS resultó ser la responsable de la inhibición ⁹.

Desde el 2017 la OMS incluye a *Klebsiella pneumoniae* KPC⁺ en su lista de prioridad crítica de microorganismos para los cuales nuevas terapias se necesitan urgentemente ^{4,5}. Una de las principales razones es que el creciente aislamiento de cepas resistentes a los antimicrobianos de último recurso en la clínica casi no deja opciones terapéuticas para su tratamiento. Aunque en los últimos años se están investigando diversos enfoques terapéuticos, como el uso de bacteriófagos, péptidos antimicrobianos y el desarrollo de anticuerpos contra moléculas de superficie, en la actualidad no existen candidatos en fases

avanzadas para el tratamiento de infecciones por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente.

Mucho se ha estudiado de *Klebsiella pneumoniae* y la respuesta inmune, pero la continua evolución bacteriana junto con la aparición de nuevos mecanismos de evasión evidencia que nuestra comprensión de la patogénesis de esta bacteria sigue presentando interrogantes. Como también hemos visto, aún queda mucho por clarificar en torno al rol de las células inmunes en la respuesta frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente. Por lo tanto, los esfuerzos por entender los diversos mecanismos de evasión que presenta *Klebsiella pneumoniae* son fundamentales para lograr avanzar en el desarrollo tanto de medidas preventivas como terapias para combatir estas infecciones.

En consecuencia, en el presente trabajo profundizamos el estudio de la interacción entre el clon hiper-epidémico Kp y una célula central de la respuesta inmune innata como es el PMN. En particular, nos focalizamos en dilucidar los mecanismos involucrados en la evasión de la respuesta bactericida del PMN mediada por Kp.

MATERIALES Y METODOS

1. Bacterias utilizadas y condiciones de crecimiento

Los experimentos realizados fueron llevados a cabo utilizando las siguientes bacterias:

- Un aislado clínico local de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC) perteneciente al secuenciotipo (ST) 258 (ID de cepa: M9885), llamada Kp a lo largo del trabajo. La identificación de género y especie, así como las pruebas de sensibilidad antimicrobiana preliminar, fueron llevadas a cabo mediante el sistema Vitek 2® Compact. Además, se realizaron pruebas de dilución en caldo para determinar concentración inhibitoria mínima y difusión en agar según el método de Kirby-Bauer, para medir halos de sensibilidad. El mecanismo específico de resistencia a los carbapenemes fue identificado mediante detección del gen blaKPC por PCR (primers KPC-F: AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG y KPC-R: AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA) ⁷, mientras que el análisis del secuenciotipo fue realizado mediante Multi-Locus Sequence Type (MLST) acorde a las indicaciones de la página web Klebsiella Sequence Typing, del Instituto Pasteur (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Todas las pruebas de caracterización genotípica y fenotípica de la cepa fueron llevadas a cabo en el Servicio de Antimicrobianos, Dpto. Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS “DR. CARLOS G. MALBRAN”.

- Una cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922™, denominada Eco, como control positivo capaz de inducir una fuerte respuesta por parte del PMN.

- Una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, denominada Sau, fue utilizada como estímulo positivo para la formación de NETs.

- Otros aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (caracterizados de forma similar a Kp en el Servicio de Antimicrobianos, Dpto. Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS “DR. CARLOS G. MALBRAN”). Sus características se resumen en la **Tabla 1** (ver Resultados).

Todas las especies bacterianas fueron conservadas en medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) con 20% glicerol, a -80°C. Para usar las cepas, las mismas son descongeladas y sembradas en agar tripteína soya (TSA, Laboratorios Britania, Buenos Aires), para luego ser incubadas por 24 horas a 37°C. Una vez obtenidas colonias aisladas, se realizan periódicamente un grupo de pruebas bioquímicas de identificación (ver tabla a continuación), para asegurar la pureza del aislamiento.

TSI (Triple Sugar Iron)	MIO: Motilidad-Indol-Ornitina
Ácido/ácido *	Motilidad negativa *
Sulfuro negativo *	Indol: negativa *
	Ornitina descarboxilasa: positiva *
Prueba de Citrato	Prueba de Voges/Proskauer
Positiva *	Positivo *

* Resultado esperado para *Klebsiella pneumoniae sp. pneumoniae*. El set mencionado incluye el mínimo de pruebas bioquímicas clave para este género y especie, considerando que se trata de cepas preservadas en estado puro, luego de su fenotipificación completa.

Para su utilización en los experimentos, fue tomada una colonia de cada aislamiento y se inoculó en caldo tripteína soya (TSB), para ser incubado por 24 horas a 37°C. Al día siguiente, se tomaron 100 µl del caldo cultivado y se inocularon en 5 ml de TSB fresco. Se incubó durante 4 horas a 37°C, en agitación a 200 rpm, con el fin de alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, asegurando el pleno desarrollo metabólico de la bacteria. De este cultivo, se tomó 1 ml y se centrifugó a 6000 rpm por 10 min, se lavó con buffer fosfato salino (PBS) 1X y se resuspendió nuevamente en PBS 1X. Finalmente, la suspensión bacteriana fue ajustada a una densidad óptica (DO), mediante el uso de un espectrofotómetro, que se correspondiera a una concentración de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonia (UFC)/ml. Para cada cepa en particular, fue realizada una curva de calibración relacionando la DO y las UFC. De las suspensiones bacterianas ajustadas a concentración, se tomaron 100 µl para realizar diluciones seriadas, sembrar en placas de TSA y confirmar, al día

siguiente, la concentración UFC/ml utilizada. En todos los casos, se utilizó una proporción bacteria: PMN de 10:1, salvo indicación.

2. Generación de bacterias recombinantes expresando la Proteína Verde Fluorescente (GFP)

La generación de estas cepas fue posible gracias a una colaboración con la Dra. Fabiana Bigi, del Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), CONICET. Brevemente, 50 µl de Kp o Eco fueron cultivados en medio Luria Bertani (LB, Laboratorios Britania, Buenos Aires) hasta alcanzar una DO 600 nm= 0.6. Luego, las bacterias fueron centrifugadas a 10000 g durante 10 min, lavadas con PBS 1x con 10% glicerol y finalmente resuspendidas en 500 µl de PBS1x con 10% glicerol. Las bacterias (50 µl de la suspensión), fueron permeabilizadas por electroporación con 1 µl del plásmido pML1335 (provisto amablemente por el Dr. Michel Niederweis) a 200 ohms, 2,5V y 25 µFa. El plásmido pML1335 ¹⁹³ contiene el gen GFP bajo el promotor de microbacteria (Psmyc). El vector contiene ColE1 para su replicación y un gen de resistencia a higromicina. Después de la electroporación, las bacterias fueron cultivadas en 1 ml de medio SOC durante 1 hora y luego servidas en una placa de agar LB con 200 µg/ml de higromicina para seleccionar a las resistentes e incubadas durante la noche a 37°C.

La cepa recombinante de Eco fue exitosamente seleccionada de esta forma, ya que la cepa nativa es sensible a higromicina. Sin embargo, el aislamiento clínico de Kp es resistente a higromicina, por lo que, para seleccionarla, las colonias individuales fueron observadas bajo el microscopio, irradiando las bacterias con luz ultravioleta y seleccionando aquellas que evidenciaron un color verde. Luego de la selección, se realizaron las pruebas correspondientes para asegurar la identificación de las cepas y, en el caso de Kp, se hizo la identificación del gen *bla_{KPC}* mediante PCR, asegurando así que efectivamente era una cepa recombinante de la Kp nativa.

3. Aspectos éticos y obtención de las muestras de sangre

Todas las muestras humanas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de dadores voluntarios sanos según las pautas institucionales (Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina). Dicho estudio recibió la aprobación de los correspondientes Comités de Ética institucionales y el consentimiento informado fue proporcionado por escrito por todos los dadores.

Los dadores de sangre declararon no haber tomado ninguna medicación en los últimos 10 días previos al día de la toma de la muestra. La sangre se obtuvo por punción venosa de la vena del antebrazo y se extrajo directamente en tubos de polipropileno con citrato de sodio (3,8% p/v, Merck) como anticoagulante.

4. Purificación de polimorfonucleares neutrófilos (PMN)

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) fueron aislados por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Ficoll Pharmacia, Uppsala; Hypaque, Wintthrop Products, Buenos Aires, Argentina) y posterior sedimentación con dextrán, tal como se describió previamente ^{17,194}.

Los eritrocitos contaminantes fueron lisados por shock hipotónico. Tras el lavado, las células (96 % de PMN, según visualización microscópica con tinción de Turk) fueron suspendidas en medio RPMI 1640 suplementado con 2 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor. El recuento de las células se realizó en cámara de Neubauer con solución de Turk (0.01% de violeta de genciana en 2% ácido acético).

5. Aislamiento de plaquetas (PLT) y parámetros de activación

El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación de las muestras de sangre a 200 g por 10 min. Para evitar la contaminación de leucocitos, solo se recolectó el 75 % superior del PRP. Luego, el PRP colectado se centrifugó en presencia de 75 nM de prostaciclina (PGI₂) (Cayman Chemical) para evitar la activación plaquetaria por centrifugación. Finalmente, las plaquetas (PLT) fueron resuspendidas en medio RPMI 1640. Para los experimentos donde

se evaluó la respuesta de los PMN en presencia de PLT, se utilizó una proporción fisiológica de 50:1 PLT:PMN.

Para evaluar la activación de las PLT, PLT purificadas fueron incubadas con Kp en diferentes relaciones PLT: bacteria, por 15 min a 37°C. Luego, se agregó un anticuerpo específico anti-CD62P (anti-p-selectina) conjugado con FITC por 15 minutos. Finalmente, por citometría de flujo se determinó la expresión de p-selectina, como parámetro de activación plaquetaria.

Con el fin de evaluar la unión de Kp a las PLT, PLT purificadas fueron incubadas con GFP-Kp en diferentes relaciones PLT: bacteria, por 15 min a 37°C. Luego, se agregó un anticuerpo específico anti-CD61 (identificador de PLT) conjugado con PE por 15 minutos. Finalmente, por citometría de flujo determinamos la unión en la población doble positiva, siendo PLT (CD61⁺) unidas a Kp (GFP⁺).

6. Obtención de suero humano y opsonización

Un pool de sueros humanos (HS) fue obtenido a partir de muestras de sangre de donadores sanos (n=10) recolectada sin anti-coagulante. Se dejó coagular la sangre, se centrifugó para separar el suero y se incubó cada suero a 56 °C durante 30 min, para inactivar el complemento.

Para evaluar la opsonización por los anticuerpos naturales presentes en HS, se incubó a Kp con el pool de HS durante 30 min (Kp-HS), se lavó y Kp-HS fue utilizada como estímulo para los distintos ensayos. La opsonización de Kp se confirmó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-IgG e IgM humanos conjugados con FITC (Dako, F(ab')₂).

7. Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) fue determinada mediante citometría de flujo utilizando la sonda dihidrorodamina-123 (DHR, Sigma-Aldrich), siguiendo un protocolo ya descrito¹⁹⁵. Brevemente, 5×10^5 PMN purificados fueron pre-incubados durante 15 min a 37 °C con 1 μ M de DHR en RPMI con 2% SFB. Posteriormente, las células se

incubaron con los estímulos indicados durante 30 minutos a 37 °C en 5 % CO₂. Inmediatamente después, se determinó la fluorescencia verde mediante citometría de flujo.

A su vez, la producción de ROS también fue evaluada en sangre entera. Una alícuota de 100 µl de sangre entera, anticoagulada con citrato de sodio 3,2% p/v, fue incubada con DHR 10 µM durante 15 min. Luego, se agregó la cantidad de bacteria (Kp o Eco) necesaria para tener una relación final de 10 bacterias por cada PMN, previo recuento diferencial de los leucocitos en sangre entera. Después de 30 minutos, la sangre fue tratada con una solución de lisis fijadora comercial (BD, FACS Lysing Solution, San Jose, CA, USA) y la producción de ROS fue evaluada inmediatamente después mediante citometría de flujo, como ya fue descrito. Se calculó el porcentaje de células positivas para DHR en la población de PMN, determinada según sus parámetros FSC y SSC.

8. Formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

Para la determinación de la formación de NETs suicidas, PMN purificados (5×10^5) fueron sembrados suavemente sobre cubreobjetos de vidrio redondos, en placas de 24 pocillos. Previamente, los vidrios fueron tratados con 0.001 % de polil-L-lisina, para favorecer la adhesión de las células. Se permitió que los PMN se asentaran y luego fueron incubaron en presencia o ausencia (Basal, sin estimular) de los estímulos indicados durante 3 horas a 37 °C en 5 % CO₂. Como estímulos positivos, se utilizó 20 nM de PMA (Merck), la bacteria Eco o 5 µM de ionomicina (Iono, Merck). Para determinar la formación de NETs vitales, los PMN fueron pre-incubados durante 90 minutos con Kp y luego estimulados durante 1 hora con Sau, en una proporción bacteria:PMN de 10:1.

La formación de NETs fue evidenciada a partir de la determinación de tres parámetros distintos: microscopía confocal, medición de ADN de cadena doble y actividad de MPO. En la determinación de la formación de NETs inducidas por PMA en presencia de los distintos aislados de *Klebsiella pneumoniae*, los resultados se expresaron como un porcentaje (%) de inhibición, calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Aislado+PMA}}{\text{PMA solo}}\right) \times 100$$

8.1. Determinación de NETs por microscopía confocal

Una vez concluido el tiempo de incubación, se retiró suavemente el medio de cultivo y se procedió a fijar las muestras agregando paraformaldehído (PFA) 4% por 15 minutos. Luego, se lavó con PBS 1X y se realizó una inmunomarcación. De manera extracelular, se marcó la elastasa utilizando un anticuerpo primario específico y su correspondiente anticuerpo secundario (Merk Millipore, Darmstadt, Alemania). Para visualizar el ADN se utilizó una solución de ioduro de propidio 2 µg/ml en medio de montaje vectashield. Utilizando un microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con un objetivo Plapon 60x/1.42 se tomaron las imágenes para cada tratamiento. Se observaron al menos 10 campos diferentes en cada tratamiento (x200). Las imágenes fueron utilizadas para determinar el área de las NETs, en al menos 5 imágenes obtenidas a x200, utilizando un script generado en el software FIJI. La escala de la medición se obtuvo de los datos proporcionados en la imagen del microscopio confocal. Brevemente, el análisis involucra un paso de umbralización, determinando qué es señal positiva para la doble marca ADN y elastasa, para luego calcular las áreas.

8.2. Medición de ADN de cadena doble (ADNdc) y la Actividad MPO

1 x 10⁶ PMN purificados fueron incubados en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero sin colocar un cubreobjetos, en una placa de 24 pocillos. Después del período de incubación, se agregó una Nucleasa S7 micrococcal (4 U, Roche Diagnostics) durante 15 min a 37 °C, con el fin de cortar y liberar las NETs del cuerpo celular de los PMN. Inmediatamente después se

inactivó la enzima mediante la adición de 5 mM de EDTA. Los sobrenadantes se recolectaron y centrifugaron dos veces, primero a 900 xg y luego a 9600 xg, para separar los PMN y las bacterias, respectivamente. Finalmente, para determinar la presencia de ADN de cadena doble, se utilizó un kit comercial (Invitrogen, Thermo Fisher), que contiene picogreen como el intercalador de ADN y se determinó su concentración utilizando un fluorómetro (Espectrofotómetro DeNovix DS-11). En los mismos sobrenadantes libres de células, la actividad MPO fue determinada utilizando el sustrato específico 3, 3', 5, 5'-tetrametil-bencidina (TMB) (Invitrogen, Thermo Fisher), midiendo la absorbancia resultante a 450 nm y sustrayendo la absorbancia a 550 nm (450–550 nm).

La formación de NETs en sangre entera fue determinada después de 3 h de incubación de la sangre con las bacterias (Kp o Eco), en una proporción 10:1 bacteria: PMN, previo recuento diferencial de los leucocitos en sangre entera. En este caso, sólo se realizó la medición de ADN de cadena doble en los sobrenadantes después de un breve tratamiento con la Nucleasa S7, como se describió anteriormente. No fue posible la medición de la actividad MPO ya que en el plasma hay otras peroxidasas que no permiten hacer la determinación específica.

9. Actividad de la elastasa del neutrófilo

Para evaluar un posible impacto directo de Kp sobre la actividad de la elastasa del neutrófilo (NE), se obtuvo una fuente de elastasa mediante lisis de PMN con 0.5 % de Tritón X-100. Esta fuente de NE fue incubada durante 1 hora con diferentes cantidades de Kp. Finalmente, la actividad de la elastasa se determinó en los sobrenadantes libres de células utilizando un sustrato específico de elastasa (1 nM N-metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilida) y midiendo la absorbancia a 405 nm, sustrayendo la medición a 505 nm.

10. Localización intracelular de la elastasa por microscopía confocal

5×10^5 PMN purificados fueron sembrados suavemente sobre cubreobjetos de vidrio redondos, en placas de 24 pocillos. Previamente, los vidrios fueron tratados con 0.001 % de polil-L-lisina, para favorecer la adhesión de las células. Se permitió que los PMN se asentaran y luego fueron incubaron en presencia o ausencia (Basal, sin estimular) de los estímulos indicados. Para evaluar la presencia de elastasa en los fagosomas, el período de incubación fue de 45 min y fueron utilizadas las bacterias expresando GFP. Para determinar la elastasa en el núcleo, el tiempo de incubación fue de 60 min.

Una vez concluido el tiempo de incubación, se retiró suavemente el medio de cultivo y se procedió a fijar las muestras agregando PFA 4% por 15 minutos. Luego, se lavó con PBS 1X y se realizó una inmunomarcación. De manera extracelular, se marcó la elastasa utilizando un anticuerpo primario específico y su correspondiente anticuerpo secundario (Merk Millipore, Darmstadt, Alemania). Para visualizar el ADN se utilizó una solución de ioduro de propidio 2 $\mu\text{g/ml}$ en medio de montaje vectashield. Utilizando un microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con un objetivo Plapon 60x/1.42 se tomaron las imágenes para cada tratamiento. Se observaron al menos 10 campos diferentes en cada tratamiento (x3000) y se tomaron imágenes para alcanzar un número significativo de PMN.

Para la co-localización de elastasa con la bacteria-GFP en fagosomas, se consideraron sólo PMN con bacteria internalizada y se cuantificó, por PMN, el número de bacterias-GFP positivas co-localizando o no con elastasa, para determinar el porcentaje de co-localización de las bacterias con elastasa.

Para la determinación del porcentaje de PMN con elastasa nuclear al menos 100 PMN fueron observados, se determinó la localización de la elastasa (citoplasmática y nuclear) y se calculó el porcentaje de PMN con elastasa nuclear dividiendo el número de PMN con elastasa nuclear sobre el total de PMN observados.

11. Análisis a través de imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la obtención de las muestras para su posterior procesamiento y adquisición de las imágenes por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), se incubaron 30×10^6 PMN purificados con Kp o Eco durante 1 hora a 37°C . Luego, para eliminar la bacteria extracelular, se agregó colistina $50 \mu\text{g/ml}$ y se incubó por 1 hora más. Se lavaron las células, se agregó RPMI 2% SFB y se incubó a 37°C durante 1 o 3 horas más, con el fin de observar las bacterias intracelulares luego de 3 o 5 horas de incubación, respectivamente. Tras el período de incubación, las células fueron centrifugadas, lavadas y fijadas durante 4 horas a 4°C . El pellet obtenido tras la fijación fue lavado y enviado al servicio de TEM de LANAIS-MIE (UBA-CONICET) para su procesamiento. Las imágenes fueron adquiridas en un Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss EM 109T, equipado con una cámara digital Gatan ES1000W.

12. Eliminación bacteriana intracelular por recuento de UFC

Para evaluar la capacidad de eliminación intracelular de los PMN frente a Kp (y Eco como control positivo) se incubaron 1×10^6 PMN purificados con 1×10^6 UFC, representando una relación bacteria: PMN de 1:1, en una placa de 24 pocillos. Una hora después de la incubación, las células fueron centrifugadas y los pellets conteniendo los PMN fueron tratados con colistina a $50 \mu\text{g/ml}$ durante 1 hora para eliminar las bacterias extracelulares. Tras el tratamiento con colistina, se realizó un lavado, el pellet fue inmediatamente resuspendido en RPMI 2% SFB y se incubó a 37°C durante 1 o 3 horas adicionales (un total de 3 o 5 horas, respectivamente). Luego, las células fueron centrifugadas y lisadas con H_2O , para luego realizar diluciones y sembrar en placas de TSA. Al día siguiente, el número de UFC intracelulares totales fue determinado por recuento de UFC. Antes del experimento, se confirmó la sensibilidad a la colistina ($50 \mu\text{g/ml}$ durante 15, 30 y 60 min) para Kp y Eco.

En el experimento planteado para evaluar si la presencia de Kp modula la capacidad de eliminación intracelular de Eco, los PMN (1×10^6) fueron incubados con Eco expresando GFP (1×10^6 UFC) solo o en presencia también de Kp

(10×10^6 UFC) en una placa de 24 pocillos durante 1 hora a 37°C. Luego, las células fueron centrifugadas y los pellets que contenían los PMN fueron tratados con gentamicina (200 µg/ml durante 15 min), antibiótico capaz de eliminar a Eco-GFP extracelular. Posteriormente, los PMN fueron lisados con H₂O, se realizaron diluciones seriadas y se sembró en placas de TSA. Las UFC fueron contadas al día siguiente utilizando un transiluminador UV, el cual permite diferenciar las colonias GFP⁺ (Eco) de las negativas (Kp).

13. Evaluación de la actividad bactericida total por recuento de UFC

Para evaluar la capacidad bactericida total de los PMN frente a Kp (y Eco como control positivo) se incubaron 1×10^6 PMN purificados con 1×10^6 UFC, representando una relación bacteria: PMN de 1:1, en una placa de cultivo celular de 24 pocillos, durante 3 horas a 37°C. Además, se incubaron las bacterias en ausencia de PMN. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron diluciones seriadas y se sembró en placas de TSA. Se cuantificaron las UFC para las bacterias solas o en presencia de los PMN. La actividad bactericida de los PMN fue determinada considerando cuántas UFC se obtuvieron en presencia de PMN con respecto a las UFC obtenidas en ausencia de los PMN (UFC relativas), siendo: $\text{UFC relativas} = (\text{UFC con PMN} / \text{UFC sin PMN})$

14. Ensayo de fagocitosis

Para determinar la fagocitosis frente a Kp-HS 5×10^5 PMN fueron incubados con GFP-Kp o GFP-Kp-HS en una relación bacterias:PMN 10:1, por 30 min a 37°C. Luego, los PMN fueron tratados con colistina a 50 µg/ml durante 30 min más a 37°C, para eliminar la bacteria extracelular asociada al PMN. Luego de la incubación, las células fueron analizadas mediante citometría de flujo y se determinó el porcentaje de PMN positivos para GFP, como un parámetro de cuántos PMN fagocitaron bacteria, así como la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los PMN, como un parámetro de cuánta bacteria habría por PMN.

15. Ensayo de *time lapse*

4x10⁵ PMN purificados fueron colocados en una placa de Petri de 35 mm con el vidrio para microscopía confocal ya incorporado (BIOFIL, Confocal Dish). Se agregó GFP-Kp o GFP-Eco en una relación bacteria: PMN 10:1, junto con yoduro de propidio 1 µg/ml e inmediatamente después comenzó la adquisición utilizando un microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con un objetivo Plapon 60x/1.42 y un dispositivo *time-lapse*, capaz de mantener las condiciones de CO₂, temperatura y humedad.

16. Evaluación de la degranulación de gránulos azurófilos

5x10⁵ PMN purificados fueron enfrentados con Kp o Eco en la relación indicada, por 2 horas a 37°C. La expresión de CD63 fue determinada por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo primario específico anti- CD63 humano (BD Pharmingen™) y un secundario específico conjugado a FITC (ThermoFisher, eBioscience™). Los restos celulares (o *debris*) se excluyeron mediante el FSC-SSC (forward vs. side scatter) y se determinó el porcentaje de células positivas para CD63.

17. Polimerización de actina por citometría de flujo

Para evaluar la polimerización de actina, 5x10⁵ PMN purificados fueron incubados con los estímulos indicados (Eco o Kp en relación bacteria: PMN 10:1 o fMLP 1.10⁻⁷ M), por distintos tiempos. Concluido el tiempo de incubación, los PMN fueron fijados con PFA 0,5 % por 15 minutos. Luego, las células fueron tratadas con 0.1 % de Tritón X-100 durante 15 min para permabilizar y luego con albúmina sérica bovina (BSA) 3% durante 1 hora para bloquear. Finalmente, se marcaron los extremos de la actina utilizando faloidina-TRITC (Merck) durante 30 minutos. Se determinó la IMF para cada tratamiento, como parametro de polimerización de actina, por citometría de flujo.

18. Evaluación de la quimiotaxis hacia fMLP

La quimiotaxis se cuantificó utilizando una cámara de Boyden (Betsuyaku et al., 1999, ver esquema en la **Figura 28**). En los pocillos inferiores de la cámara de Boyden se colocó RPMI 2% SFB como control o fMLP $1 \cdot 10^{-7}$ M como estímulo quimiotáctico. Una membrana de policarbonato con poros de 3 μ m de diámetro (Neuro Probe Inc. Gaithersburg MD, USA), se utilizó para separar el estímulo de los PMN, modelando el endotelio que deben atravesar los PMN para extravasar. 50 μ l de una suspensión de PMN purificados, conteniendo 1×10^5 PMN en RPMI 2% SFB, se colocó en los pocillos superiores de la cámara de Boyden delicadamente, para no generar burbujas ni agujerar la membrana. Luego, la cámara se incubó por 30 min a 37 °C. Luego de la incubación, la membrana fue retirada cuidadosamente y teñida con un kit de tinción comercial (TINCION-15, Biopur SRL, Rosario, Argentina). El número de células migradas y retenidas en la superficie inferior de la membrana fue determinado analizando cinco campos aleatorios en un microscopio en campo claro (x 1000). Cada tratamiento fue realizado por triplicado dentro de cada experimento.

19. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism (Versión 8.4). La normalidad de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para comparaciones múltiples, se aplicó un análisis de varianza (one-way ANOVA), seguido del post test de Tukey. En las comparaciones entre dos grupos, se empleó la prueba t de Student, pareada o no pareada según correspondiera.

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ error estándar (SEM). Cada punto dentro de las columnas en los gráficos representa un dador independiente de PMN. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1 – Estudio de la formación de NETs frente a Kp

1.1. Los PMN no son capaces de contener a Kp

A lo largo de estos años el grupo ha estudiado la respuesta temprana del PMN frente a Kp. Brevemente, hemos encontrado que frente al encuentro con Kp, PMN humanos aumentan la expresión de marcadores de activación, como CD11, CD15 y CD66b, y son capaces de fagocitar a la bacteria. Sin embargo, se induce una pobre producción de ROS y los PMN no logran eliminar eficientemente a Kp *in vitro* ⁹.

A partir de estos resultados, nos preguntamos si Kp podría estar modulando otras funciones bactericidas del PMN que median la muerte extracelular, como la formación y liberación de NETs, un mecanismo de respuesta más tardía del PMN frente a Kp. En primer lugar, como para tener una visión global real de los eventos que se suceden en la interacción entre los PMN y Kp a lo largo del tiempo, realizamos un ensayo de *time lapse*, donde utilizamos bacteria transformada expresando la proteína verde fluorescente (GFP) y visualizamos a los PMN por su contraste interdiferecial (DIC). Como control de una eficiente respuesta bactericida utilizamos una cepa ATCC de Eco ^{9,17} también expresando GFP. Además, incorporamos al medio ioduro de propidio (en rojo), capaz de ingresar a la célula cuando la membrana plasmática pierde su integridad, representando una señal de muerte, que ocurriría en la inducción de NETs suicidas. En la **Figura 1** podemos observar capturas del *time lapse* a distintos tiempos (0, 30, 60, 90 y 120 minutos). Tal como podemos ver en las imágenes, Kp es capaz de continuar replicándose a lo largo del tiempo en mayor medida que Eco, evidenciando la incapacidad de los PMN para contener a Kp. A su vez, en presencia de Kp los PMN conservan su integridad de membrana, a diferencia de Eco donde se observa una gran cantidad de PMN positivos para ioduro de propidio. Por otro lado, también se observa en los PMN enfrentados con Eco una formación de “nubes” rojas extracelulares, lo cual podría ser

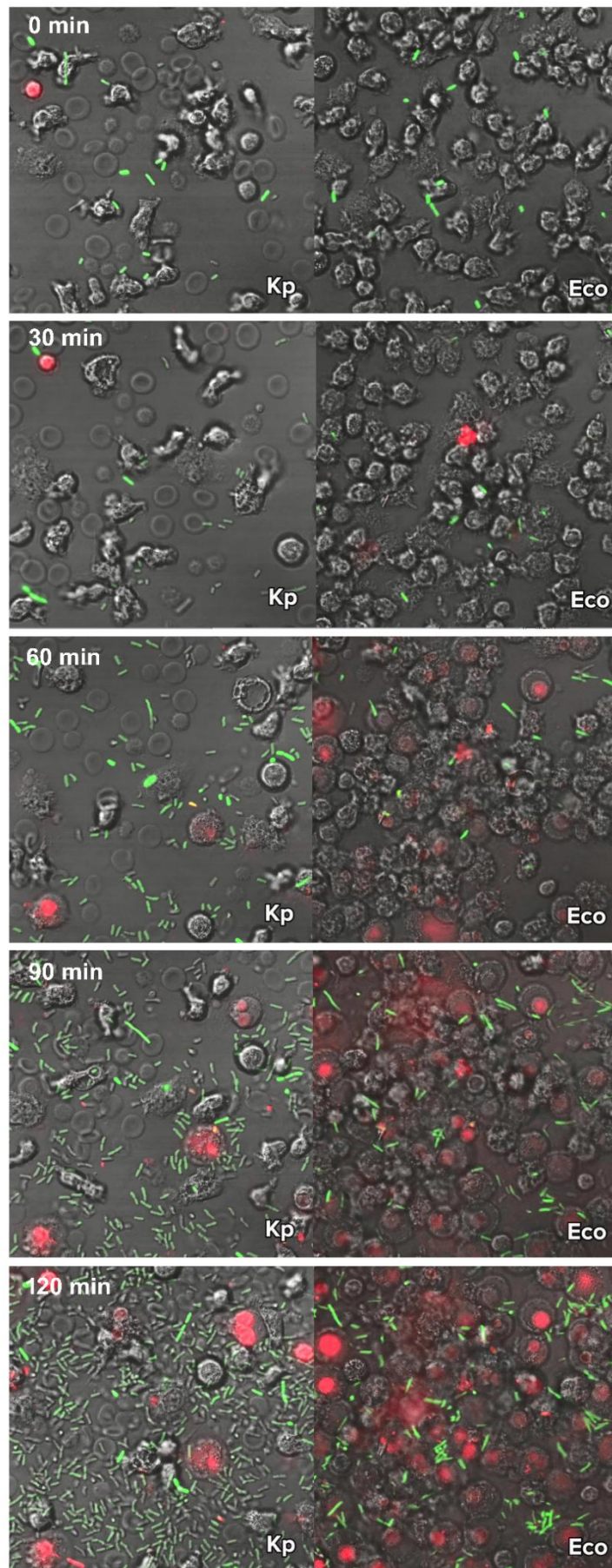


Figura 1. Los PMN son incapaces de contener a Kp. Capturas de un *time lapse* donde se incubó PMN purificados (ver DIC) con Kp-GFP o Eco-GFP (verde) en presencia de ioduro de propidio (rojo), que sólo ingresa a las células cuando hay pérdida de integridad de la membrana (en rojo).

consistente con la liberación de NETs, considerando la capacidad del ioduro de propidio de intercalarse en hebras de ADN doble cadena. Estas nubes no se observaron en respuesta a Kp. Cabe destacar que también se observa un menor número de PMN con Kp, a pesar de haberse cuantificado y agregado PMN por igual en ambas condiciones. Una posible explicación es que la activación en presencia de Eco es mayor, dando lugar a que los PMN se adhieran a la placa, mientras que con Kp los PMN continúan desplazándose. Con el objetivo de confirmar que los PMN no son capaces

de contener a Kp luego de 3 horas de incubación, indicándonos entonces algún defecto en la respuesta microbicida total, realizamos un ensayo de *killing* por recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Para esto, incubamos PMN humanos purificados de sangre periférica con Kp o Eco, durante 3 horas a 37°C con 5% CO₂. Realizamos directamente diluciones seriadas para luego sembrar una gota sobre placas de petri con TSA, y así realizar un recuento de UFC al día siguiente, como parámetro de la respuesta bactericida total de los PMN. Sin embargo, teniendo en cuenta que una diferencia en el crecimiento *per se* de cada bacteria podría condicionar el resultado, también se incubó a Kp o Eco en ausencia de PMN.

En la **Figura 2** se muestran las UFC totales (extracelular + intracelular), expresadas como UFC relativas, representando cuánta bacteria creció en presencia de los PMN con respecto a lo que crece sola. Los resultados indican que, mientras Eco es eficazmente eliminada reduciéndose significativamente su crecimiento, Kp no sólo no es eliminada, sino que parecería que logra crecer aún más en presencia de los PMN. Esto refleja que efectivamente los PMN son incapaces de contener a Kp y que, como se observa en el *time lapse*, la falta de inducción de NETs en presencia de Kp podría contribuir en esta falta de contención bacteriana.

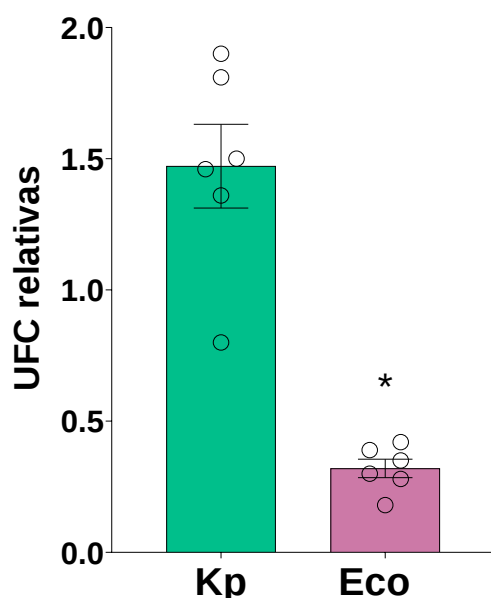


Figura 2. Los PMN no pueden eliminar a Kp luego de 3 horas. Se incubaron PMN humanos purificados con Kp o Eco MOI 1 durante 3 horas. Se realizaron diluciones seriadas y se sembró en placas de agar. Se realizó el recuento de UFC al día siguiente. Las UFC en presencia de PMN se relativizaron a las UFC luego de 3 horas de crecimiento de la bacteria sola.

1.2. Estudiar el efecto de Kp sobre los distintos tipos de NETs

1.2.1. Kp es capaz de inhibir la formación de NETs suicidas NOX-dependientes

Ante la capacidad observada de Kp de crecer extracelularmente frente al encuentro con los PMN, nos planteamos estudiar el efecto de Kp sobre la formación de NETs, una de las principales respuestas microbicidas extracelulares. Para ello, PMN humanos purificados fueron incubados con Kp, así como también con diversos estímulos positivos capaces de inducir la formación de NETs a través de distintas vías.

Como ya fue mencionado, a partir del descubrimiento de las NETs como un mecanismo extracelular relevante, capaz de contener patógenos y mediar su muerte, se han reportado diversos estímulos que generan la liberación de NETs, dando lugar así también al reporte de distintos tipos de NETs. Dado que estos estímulos difieren en las vías intracelulares involucradas, así como también en los tiempos necesarios para la inducción, es importante destacar que su utilización, entonces, podría dar indicios de los mecanismos involucrados en el impacto de Kp sobre las NETs.

Los primeros estudios de las NETs reportaban su liberación cerca de las 3 horas post estímulo, momento en el cual se rompe la membrana del PMN y, por lo tanto, muere. Considerando la pérdida de viabilidad, este tipo de NETs ha sido clasificado como suicidas, demostrándose que es un tipo de muerte distinto a la apoptosis o necrosis, por ejemplo, y hay vasta evidencia que acompaña la existencia de dos tipos de NETs suicidas según su requerimiento de la enzima NADPH oxidasa (NOX).

El primer inductor utilizado para describir las NETs NOX-dependientes, donde la producción de ROS es indispensable, fue el PMA ³, estímulo inductor de NETs sobre el cual se conocen en mayor detalle los pasos involucrados en su inducción. Por lo tanto, decidimos comenzar investigando el posible impacto de Kp sobre las NETs inducidas por PMA. PMN purificados fueron incubados durante 3 horas a 37°C con 5% CO₂ con PMA 20 nM en presencia o ausencia

de Kp. En la **Figura 3** se muestran los parámetros evaluados para determinar la formación de NETs. Como podemos ver tanto en la liberación extracelular de ADN como la actividad MPO (**Figuras 3A y 3B**), y en línea con lo observado en los experimentos de *time lapse*, Kp no es capaz de inducir la liberación de NETs, mientras que PMA es un fuerte inductor. Además, podemos ver que Kp logra disminuir la formación de NETs inducida por PMA. Con el objetivo de confirmar este resultado, cuantificamos el área de las NETs a partir de imágenes obtenidas por microscopía confocal. Para esto, los PMN fueron colocados sobre vidrios y luego de la incubación de 3 horas fijamos las células y marcamos tanto el ADN como la Elastasa, que junto con la MPO son componentes claves de las NETs. Tal como podemos observar en la cuantificación del área de las NETs (**Figura 3C**) y las imágenes representativas correspondientes (**Figura 3D**), Kp no es capaz de inducir la formación de NETs y logra reducir las NETs inducidas por PMA, en línea con lo observado en los otros dos parámetros evaluados.

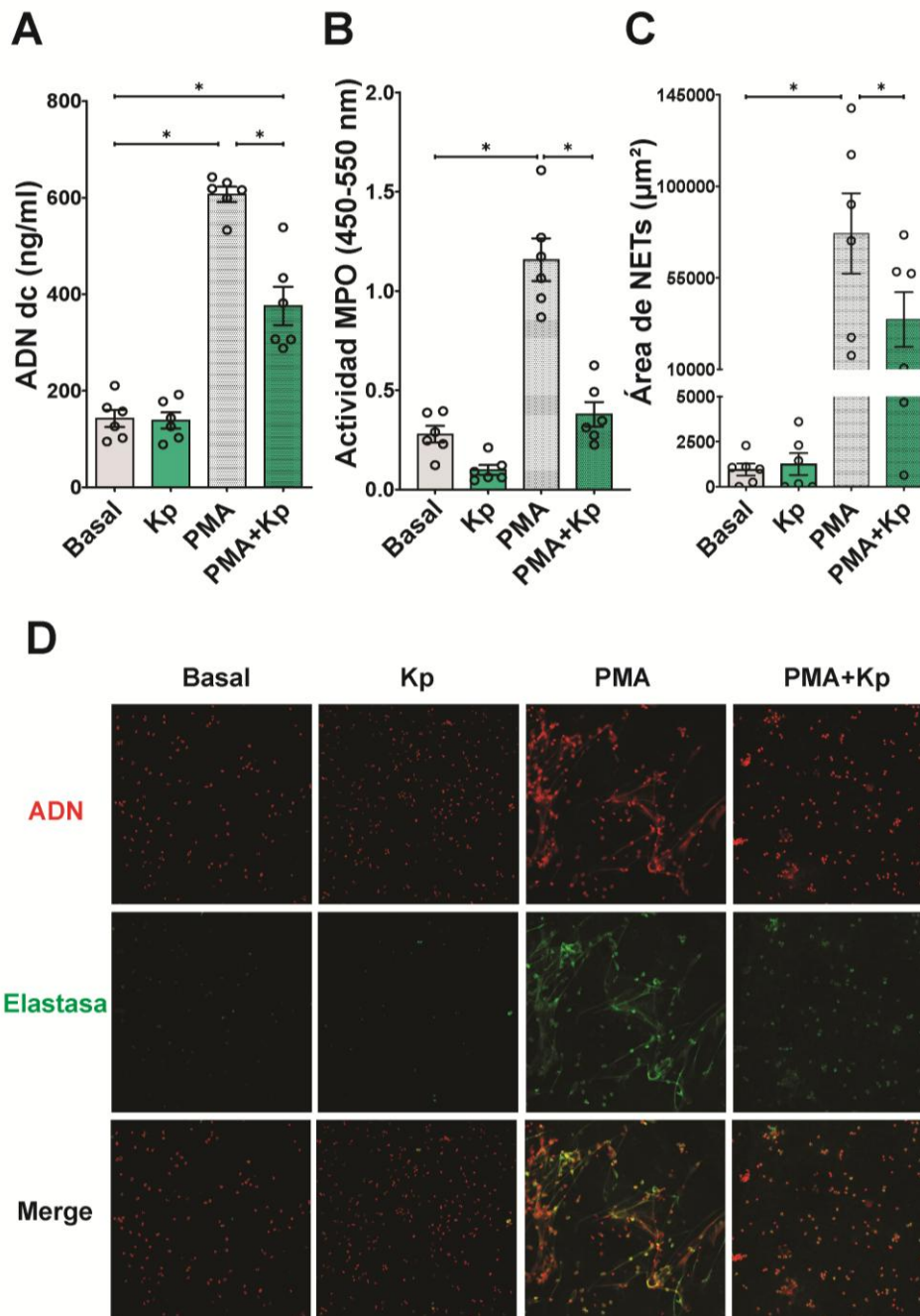


Figura 3. Kp inhibe la formación de NETs NOX-dependientes. Se incubaron PMN purificados de sangre periférica con Kp y/o PMA 20 nM, o sin tratar (basal) por 3 horas. Se determinó por distintos parámetros la formación de NETs. (A) Cuantificación de ADN doble cadena liberado al sobrenadante. (B) Cuantificación de la actividad de la proteína mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes. (C) Cuantificación del área de las NETs, a través del software Fiji. Se consideró NET a las estructuras doble positivas para ADN y elastasa. (D) Imágenes representativas de los tratamientos realizados, obtenidas por microscopía confocal. Se observa el ADN (rojo) y la elastasa (verde). Cada punto representa un dador de PMN. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

El foco de este trabajo es el impacto de un aislado clínico particular de *Klebsiella pneumoniae*, caracterizado dentro del grupo principalmente responsable de la diseminación de resistencia antimicrobiana y endémico en

Argentina: KPC⁺ y ST258 ⁷. Sin embargo, entendiendo la rápida evolución en las bacterias y que cada aislado bacteriano puede tener sus propias características, nos preguntamos si la inhibición de las NETs inducidas por PMA sería propia del aislado, de la resistencia a los carbapenems, o del ST258. O si, por el contrario, es un fenómeno común a más aislados de *Klebsiella pneumoniae*. Para responder esta pregunta, obtuvimos diversos aislados que se resumen en la **Tabla 1**. Estos aislados no sólo presentan distintas resistencias, sino que también pertenecen (en algunos casos) a distintos ST.

Aislado	Secuencia tipo (ST)	Resistencia antibiótica	ID	Fenotipo Hiperviscomucoso	Genes de Hipervirulencia	Características relacionadas a la cápsula
A	498	SHV-18	700603 (ATCC)	Negativo	Negativo	K6
Kp	258	KPC-2	M9885	Negativo	Negativo	K27
E	258	KPC-2	M22738	Negativo	Negativo	K1, K2 and K5 negativo
H	258	KPC-2	M22910	Negativo	Negativo	K1, K2 and K5 negativo
C	258	CTX-M15	M19216	Negativo	Negativo	K1, K2 and K5 negativo
F	258	AMP-C	M19091	Negativo	Negativo	K1, K2 and K5 negativo
G	258	CTX-M15	M19145	Negativo	Negativo	K1, K2 and K5 negativo
D	307	NDM	M25910	Negativo	Negativo	KL102

Tabla 1. Caracterización de los distintos aislados de *Klebsiella pneumoniae* utilizados. Se asignan letras arbitrarias a cada aislado, excepto el aislado utilizado en este trabajo de tesis, que se nombra Kp. El ID corresponde al número identificador del aislado, provisto por el Malbran. La presencia de genes de hipervirulencia y las características relacionadas a la cápsula fueron determinadas en el Malbran por PCR. El fenotipo hipermucoso se realizó en el Malbran mediante el “String test”.

Para indagar el efecto de cada aislado en particular sobre la formación de NETs, purificamos PMN, estimulamos con PMA en presencia de cada aislado y determinamos los niveles de ADN y MPO liberados, como parámetro fiel de la formación de NETs. Como podemos ver en los niveles de ADN y MPO liberados (**Figura 4A** y **Figura 4B**), junto con la tabla que resume los resultados (**Figura 4C**) todos los aislados evaluados fueron capaces de inhibir la liberación de NETs inducida por PMA. Este resultado refleja que la inhibición de NETs es un fenómeno que excede a nuestro aislado en particular y podría ser común a distintas cepas de Kp, no estando relacionado a la presencia de KPC o al ST258.

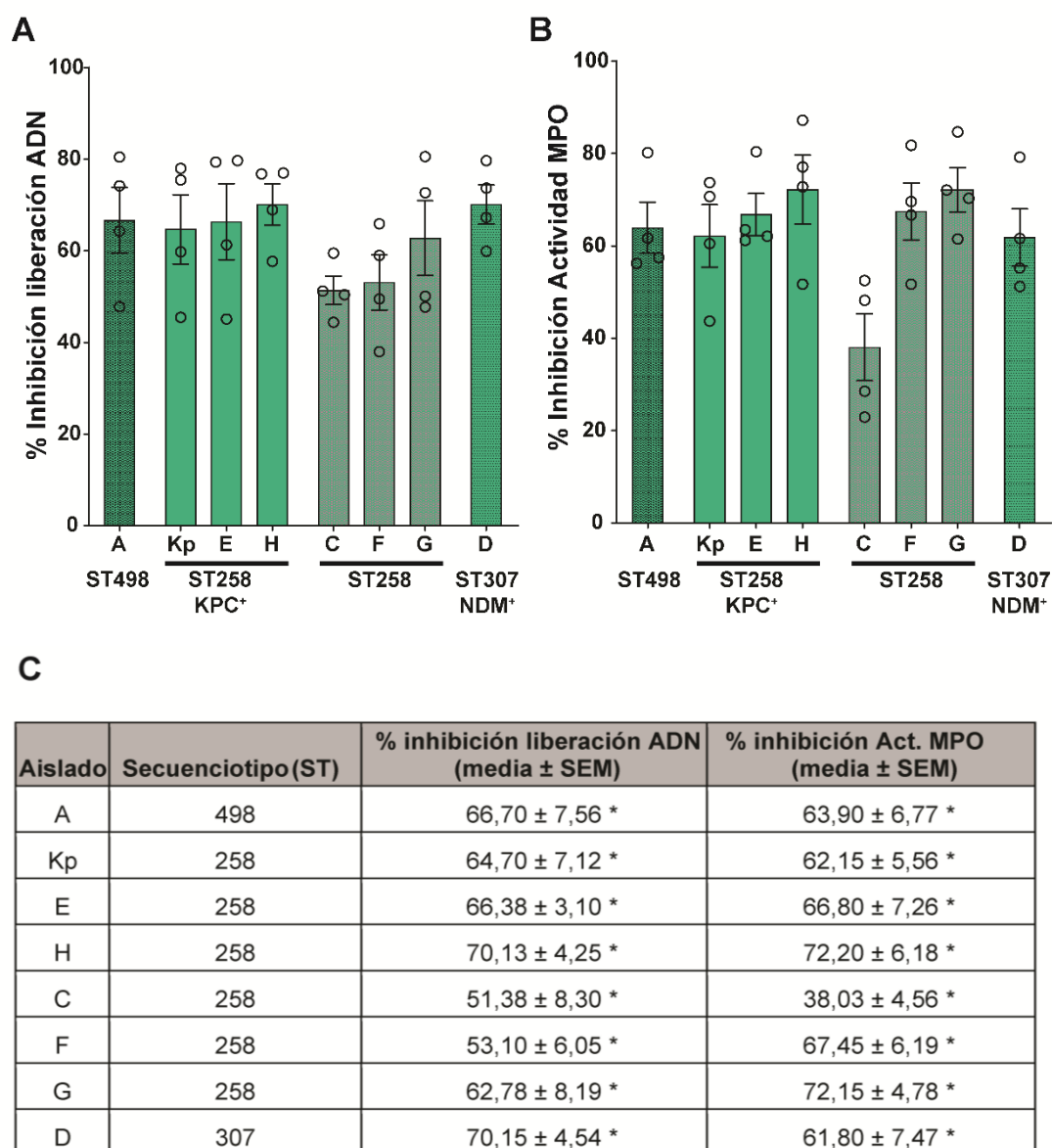


Figura 4. Distintas cepas de *Klebsiella pneumoniae* inhiben las NETs NOX-dependientes. Se incubaron PMN purificados de sangre periférica con los distintos aislados y/o PMA 20 nM por 3 horas. Se determinó la formación de NETs mediante dos parámetros. (A) Cuantificación de ADN doble cadena liberado al sobrenadante, expresado como % de inhibición de la liberación de ADN, con respecto a lo inducido por PMA solo, ver fórmula en materiales y métodos. (B) Cuantificación de la actividad de la proteína mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes, expresado como % de inhibición de la actividad MPO con respecto a lo inducido por PMA solo, ver fórmula en materiales y métodos. Cada punto representa un dador de PMN. (C) En la tabla se resumen los resultados obtenidos para cada aislado, junto con el ST. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$ vs PMN tratados sólo con PMA.

Por otro lado, para determinar si la viabilidad bacteriana y/o componentes estructurales de la bacteria podrían jugar un rol en la inhibición de la formación de NETs, Kp se fijó mediante un tratamiento con paraformaldehído (PFA), por recuento de UFC se confirmó la pérdida de viabilidad, y Kp fijada fue utilizada

como estímulo. Tal como podemos observar en los gráficos de la **Figura 5**, Kp fijada perdió la capacidad de inhibir la formación de NETs. Este resultado nos indica que es necesaria la viabilidad de Kp para mediar su efecto inhibitorio, así como también que ningún componente estructural, presente en la pared de la bacteria luego de la fijación, sería responsable del fenómeno observado.

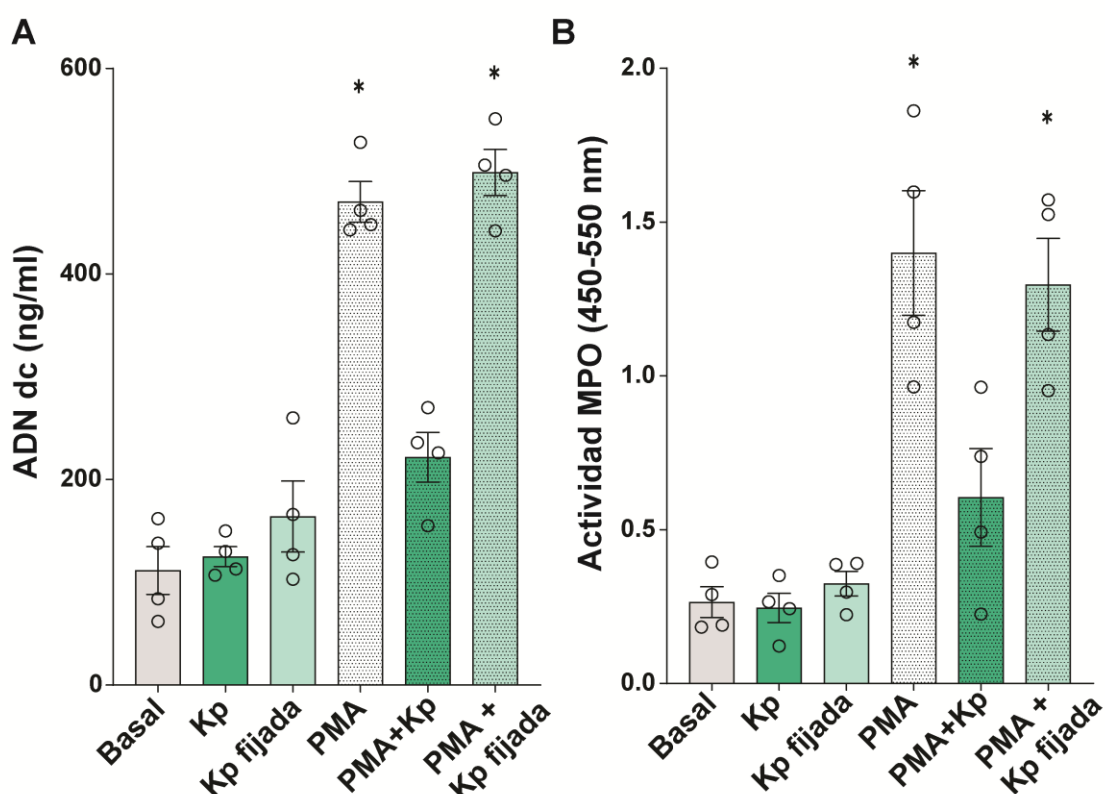


Figura 5. Kp fijada pierde la capacidad de inhibir las NETs NOX-dependientes inducidas por PMA. Se incubaron PMN purificados de sangre periférica con los estímulos indicados por 3 horas. Se determinó la formación de NETs a través de la cuantificación de ADN doble cadena liberado al sobrenadante (A) y la cuantificación de la actividad de la proteína mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes (B). Cada punto representa un dador de PMN, se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$ vs Basal.

Si bien el uso de inductores farmacológicos, como el PMA, nos permite pensar hipótesis sobre cómo Kp afecta pasos conocidos y bien caracterizados del proceso de formación de NETs, también es importante estudiar la modulación de la inducción de NETs en sus escenarios posibles, como puede ser un contexto de co-infección con otra bacteria. El estudio de las co-infecciones resulta clave dado que en la clínica son comunes las infecciones poli microbianas ¹⁹⁷. En este sentido, el perfil de respuesta inmune inducido por una bacteria podría condicionar la supervivencia de la otra o viceversa.

Entonces, nos preguntamos si Kp es capaz de modular la formación de NETs inducidas por Eco, una bacteria que induce una fuerte activación del PMN y es eliminada correctamente. Incubamos PMN purificados con Eco, en presencia o ausencia de Kp, durante 3 horas a 37°C con 5% CO₂. En la **Figura 6** podemos ver los gráficos correspondientes a la formación de NETs inducidas por Eco y el efecto que genera la presencia de Kp.

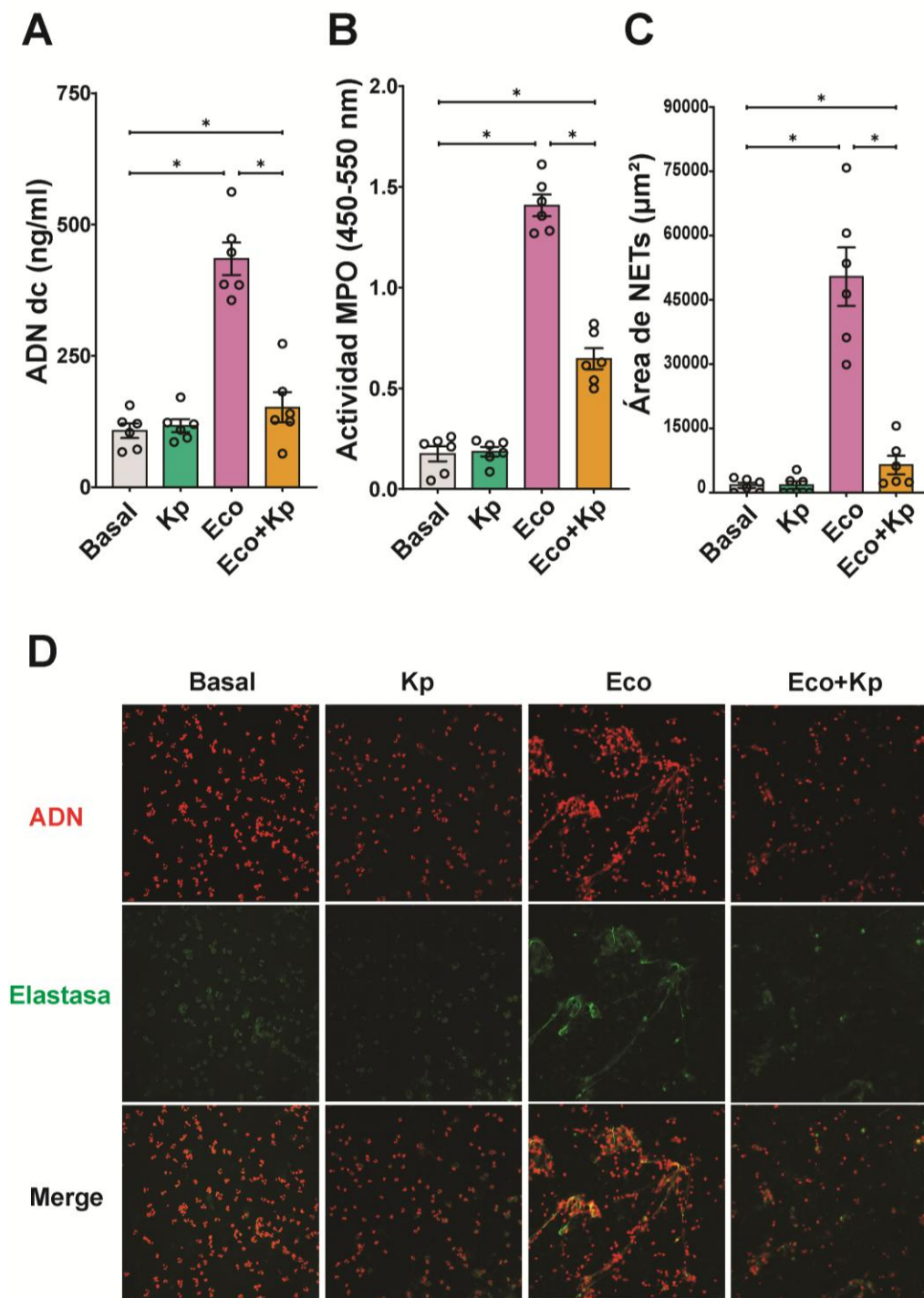


Figura 6. Kp es capaz de inhibir la formación de NETs inducidas por Eco. Se incubaron PMN purificados de sangre periférica con Kp y/o Eco MOI 1 por 3 horas. Se determinó por distintos parámetros la formación de NETs. (A) Cuantificación de ADN doble cadena liberado al sobrenadante. (B) Cuantificación de la actividad de la proteína mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes. (C) Cuantificación del área de las NETs, a través del software Fiji. Se consideró NET a las estructuras doble positivas para ADN y elastasa. (D) Imágenes representativas de los tratamientos realizados, obtenidas por microscopía confocal. Se observa el ADN (rojo) y la elastasa (verde). Cada punto representa un dador de PMN. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

Tal como se observa en la liberación de ADN y la actividad MPO (**Figura 6A y 6B**) así como en el área de las NETs determinada a partir de imágenes de microscopía confocal (**Figura 6C** e imágenes representativas en la **Figura 6D**), Kp es capaz de inhibir también la formación de NETs inducidas por Eco.

1.2.2. Kp inhibe la formación de NETs suicidas NOX-independientes y NETs vitales

Poco después de la primera descripción de las NETs y su dependencia con la formación de ROS, se reportaron estímulos capaces de inducir la liberación de NETs aun cuando la NOX se encontrara inhibida farmacológicamente ⁶⁰. En este tipo de NETs suicidas NOX-independientes, al igual que las NOX-dependientes, la elastasa junto con la MPO cumplen roles claves en la descondensación de la cromatina. En este caso, estímulos que funcionan como ionóforos del calcio son los principales inductores de este tipo de NETs, así como también algunos microorganismos ^{77,198}. Con el objetivo de continuar indagando en los posibles mecanismos detrás de la inhibición de la formación de NETs por parte de Kp, nos preguntamos si Kp podría ser capaz de afectar las NETs inducidas por este tipo de estímulos. Incubamos PMN purificados con ionomicina (iono) para inducir la formación de NETs suicidas NOX-independientes, en presencia o ausencia de Kp. Como podemos ver en la **Figura 7A y 7B**, tal como está reportado, iono induce un aumento estadísticamente significativo en la liberación de ADN y MPO. Además, podemos observar que Kp logra reducir significativamente la formación de NETs inducidas por iono. En la **Figura 7D** se muestran imágenes representativas de este fenómeno y la correspondiente cuantificación del área de las NETs (**Figura 7C**). Efectivamente, Kp es también capaz de inhibir la formación de NETs NOX-independientes.

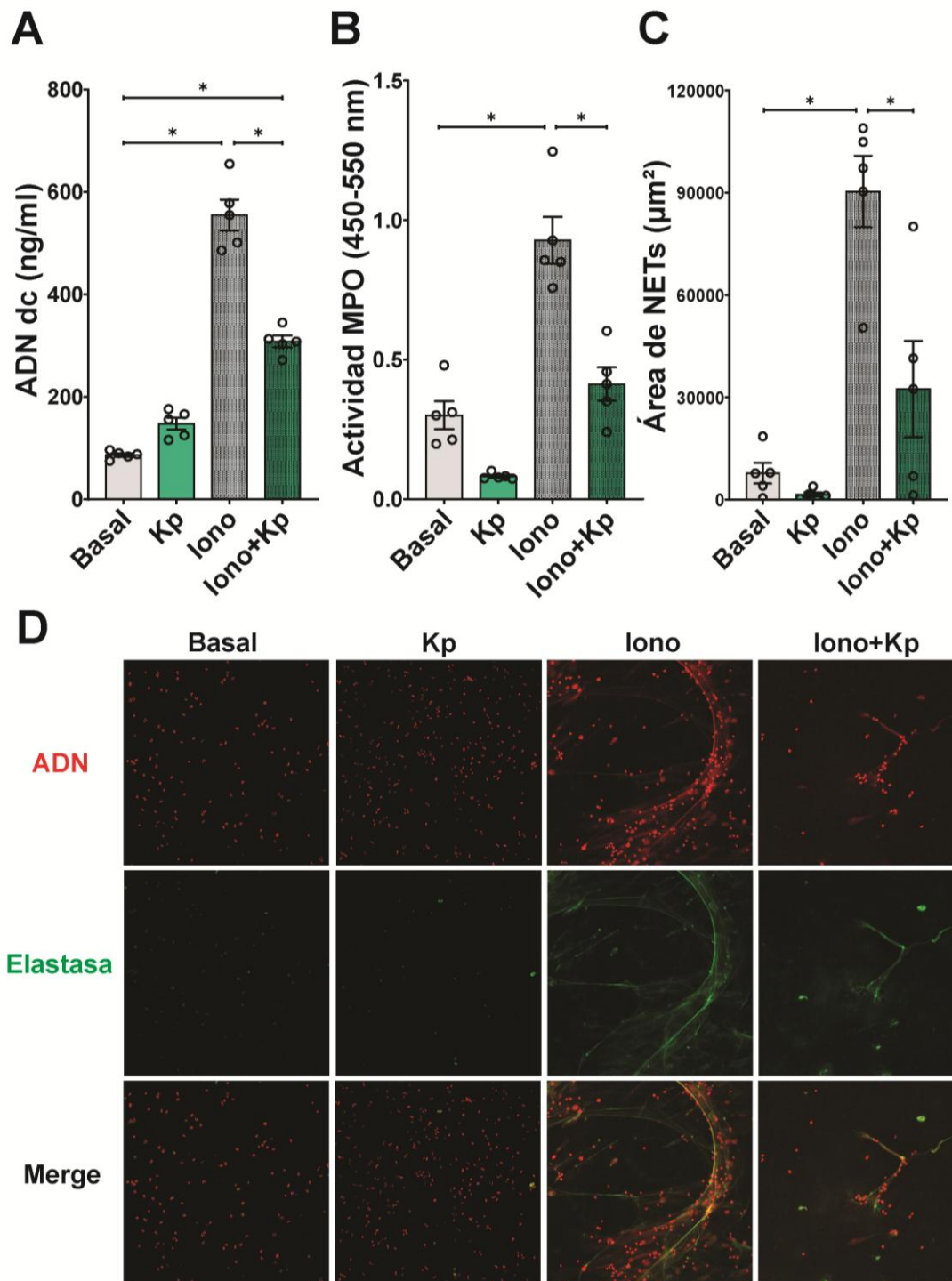


Figura 7. Kp inhibe la formación de NETs NOX-independientes. Se incubaron PMN purificados de sangre periférica con Kp y/o Ionomicina (iono) 5 μ M por 3 horas. Se determinó por distintos parámetros la formación de NETs. (A) Cuantificación de ADN doble cadena liberado al sobrenadante. (B) Cuantificación de la actividad de la proteína mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes. (C) Cuantificación del área de las NETs, a través del software Fiji. Se consideró NET a las estructuras doble positivas para ADN y elastasa. (D) Imágenes representativas de los tratamientos realizados, obtenidas por microscopía confocal. Se observa el ADN (rojo) y la elastasa (verde). Cada punto representa un dador de PMN. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. *p<0.05.

Previo al descubrimiento de las NETs suicidas, el paradigma establecido de la protección mediada por PMN implicaba procesos que requieren la viabilidad del mismo ⁷⁶. En esta aparente contradicción establecida por la existencia de las NETs suicidas es que se reportó la liberación de ADN junto con proteínas granulares (como elastasa y MPO), pero conservándose la viabilidad de los PMN. Este tipo de NETs fueron denominadas vitales y se diferencian de las NETs suicidas tanto en los mecanismos involucrados como en los tiempos de liberación del ADN. En este caso, la liberación del ADN ocurre por vía vesicular y puede ser observado a los pocos minutos de incubación con el estímulo. Se ha reportado que algunas bacterias, tal como *Staphylococcus aureus* (Sau), logran inducir la formación de NETs vitales luego de 1 hora de incubación.

A pesar de conocerse poco sobre los mecanismos y sus vías, en comparación con las NETs suicidas, nos preguntamos si Kp podría ser capaz de inducir estas NETs vitales a tiempos tempranos, e incluso si podría modular su formación inducida por Sau. Para esto, PMN purificados fueron pre-incubados o no por 1 hora con Kp y luego enfrentados con Sau en una relación 1:10 (PMN:bacteria) durante 1 hora a 37°C con 5% CO₂. Como podemos ver en la **Figura 8A y 8B**, Kp tampoco es capaz de inducir la formación de NETs vitales, mostrando niveles de ADN y MPO liberados similares a PMN sin estimular (basal). Al mismo tiempo, tal como está reportado, Sau, a diferencia de Kp, induce un aumento estadísticamente significativo en la liberación de ADN y MPO. Sorprendentemente, Kp también logra reducir los niveles de ADN y MPO inducidos por Sau, demostrando su capacidad de inhibir la liberación de NETs vitales. Con el objetivo de confirmar este resultado, quisimos visualizar este fenómeno mediante microscopía confocal, marcando tanto el ADN como la Elastasa, que junto con la MPO son componentes claves de las NETs. Como podemos observar en la cuantificación del área de las NETs (**Figura 8C**) a partir de las imágenes de microscopía confocal (**Figura 8D**), Kp no es capaz de inducir la formación de NETs vitales y logra reducir la liberación de NETs vitales inducidas por Sau. Es importante destacar que, para estos experimentos, la pre-incubación de los PMN por 1 hora con Kp favoreció la inhibición de las NETs, a pesar de mostrarse una tendencia a disminuirlas si Kp y Sau eran agregadas al mismo tiempo.

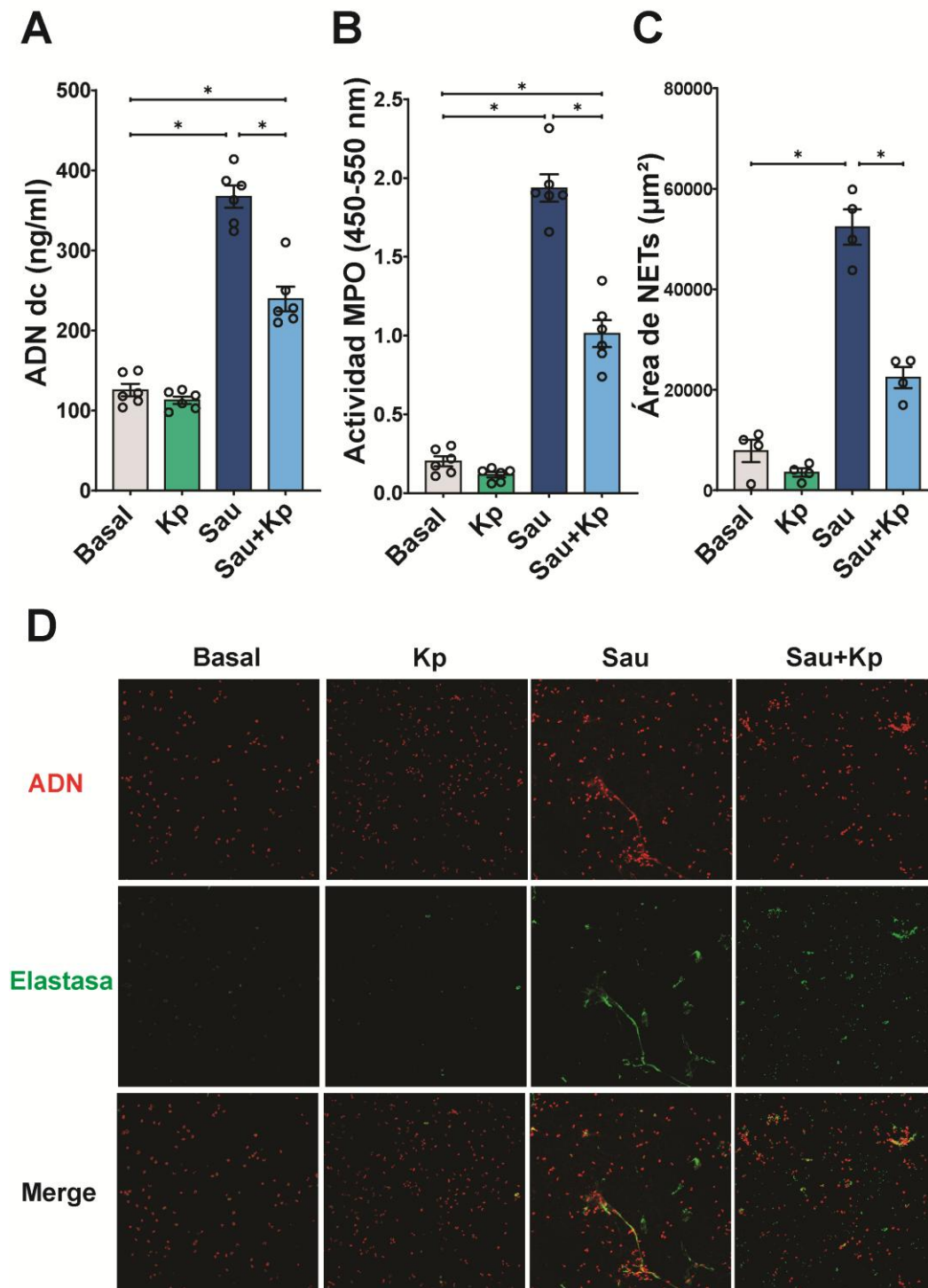


Figura 8. Kp también inhibe la formación de NETs vitales. Se incubaron PMN purificados de sangre periférica con Kp y/o Sau MOI 10 por 180 minutos. Se determinó por distintos parámetros la formación de NETs. (A) Cuantificación de ADN doble cadena liberado al sobrenadante. (B) Cuantificación de la actividad de la proteína mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes. (C) Cuantificación del área de las NETs, a través del software Fiji. Se consideró NET a las estructuras doble positivas para ADN y elastasa. (D) Imágenes representativas de los tratamientos realizados, obtenidas por microscopía confocal. Se observa el ADN (rojo) y la elastasa (verde). Cada punto representa un dador de PMN. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

Este conjunto de resultados nos permite afirmar que no sólo Kp es incapaz de inducir la formación de NETs por sí misma, sino que además afecta la formación de NETs inducida por diversos estímulos. Esto se relaciona con el mayor crecimiento bacteriano extracelular y la incapacidad de los PMN de contener a Kp, observados en la **Figuras 1 y 2**, respectivamente.

1.3. Determinar la capacidad de componentes séricos de modular la falta de NETs en presencia de Kp

1.3.1. La presencia de anticuerpos naturales no revierte la falta de NETs

Teniendo en cuenta la complejidad de la respuesta del sistema inmunitario para luchar contra los patógenos, es esencial situar a los PMN en un contexto que imite mejor un escenario fisiológico. Tanto en el lecho vascular como en los tejidos, los PMN se encuentran interactuando con diversas células, así como también componentes solubles, como son los anticuerpos, citoquinas, o el complemento, entre otros, que son capaces de modular la respuesta de los PMN. Por lo tanto, es importante también analizar la respuesta de los PMN desafiados con Kp en presencia de componentes claves de la inmunidad innata presentes en la sangre, dado que en su presencia la falta de NETs que se observa con Kp podría anularse. En este sentido, los anticuerpos naturales presentes en suero humano constituyen un factor humoral que favorecen la respuesta inmune. Son producidos espontáneamente, no son específicos contra algún patógeno en particular, pero permiten el reconocimiento de estructuras típicas de la pared celular bacteriana y su opsonización, potenciando la respuesta inmune innata.

Para indagar el rol de estos anticuerpos naturales durante la respuesta del PMN frente a Kp, utilizamos un pool de sueros humanos sanos donde inactivamos por calor las proteínas del complemento (decomplementados) (HS). Realizamos una pre-incubación de Kp con HS (Kp-HS) con el objetivo de opsonizar Kp con los anticuerpos naturales allí presentes y, luego de un lavado, utilizamos Kp-HS como estímulo.

En primer lugar, nos preguntamos si la pre-incubación con un pool de HS era capaz de opsonizar Kp. Para esto, utilizamos anticuerpos anti-IgG e IgM humanos, conjugados con FITC, que nos permitieran detectar el porcentaje de Kp asociadas con anticuerpos naturales (opsonización) mediante citometría de flujo. En la **Figura 9** podemos observar los gráficos de puntos representativos. En definitiva, la citometría de flujo confirmó la presencia de anticuerpos naturales tanto IgM como IgG que son capaces de opsonizar el 17% (**Figura 9B**, panel derecho) y el 5% (**Figura 9A**, panel derecho) de las Kp, respectivamente.

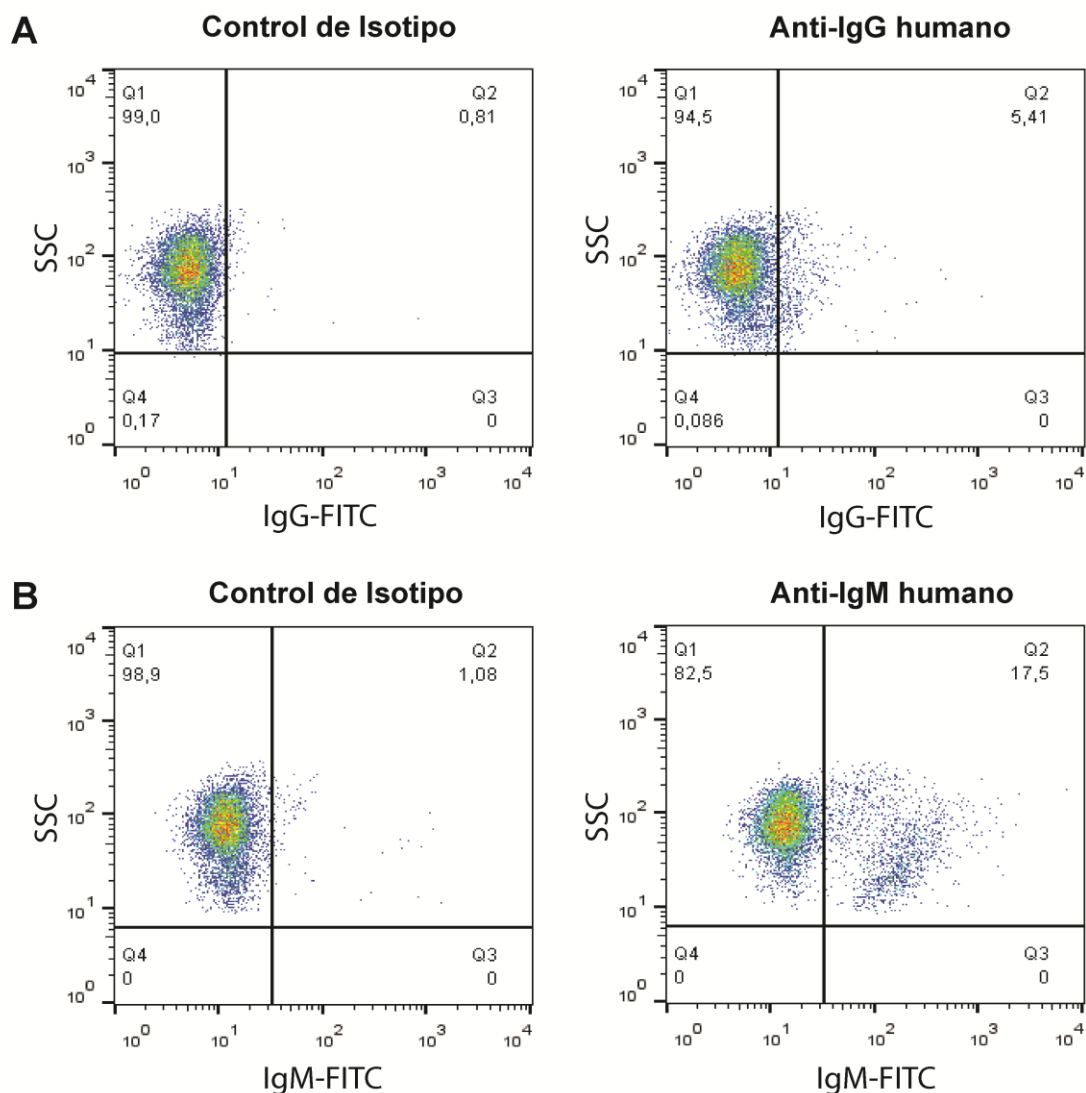


Figura 9. Dot plots representativos de la opsonización de Kp por anticuerpos presentes en suero humano (HS). Se muestran los valores de Side Scatter (SSC) y la intensidad de fluorescencia para IgG (A) o IgM (B). En ambos casos, los cuadrantes fueron definidos utilizando el control de isotipo (panel izquierdo). Los niveles de opsonización fueron determinados en el cuadrante Q2 (panel derecho).

Una de las principales funciones celulares vinculadas con la opsonización es la fagocitosis. Brevemente, la posibilidad de “marcar” patógenos con opsoninas, como son los anticuerpos o componentes del complemento, permite la participación de otros receptores fagocíticos, específicos para la porción constante de los anticuerpos o para el complemento. Al confirmar que los anticuerpos naturales son capaces de opsonizar en cierta medida a Kp, nos preguntamos si esto podría aumentar la fagocitosis de la bacteria por parte de los PMN. Para determinar la fagocitosis, utilizamos una cepa de Kp que expresa GFP. Incubamos PMN humanos purificados con GFP⁺ Kp o GFP⁺ Kp-HS durante 30 minutos en una relación PMN:bacteria 1:10. Luego, centrifugamos y resuspendimos el pellet en una solución de antibiótico colistina 50 µg/ml por 30 minutos más, con el fin de eliminar toda la bacteria extracelular adherida a los PMN. Si bien este aislado de Kp es resistente a algunos antibióticos, es sensible a la colistina, lo que fue chequeado previamente evidenciándose la falta de crecimiento de Kp con el tratamiento con colistina en la concentración y tiempo usado en estos experimentos. Finalmente, analizamos por citometría el porcentaje de PMN positivos para GFP, indicador de cuántos PMN fueron capaces de fagocitar, así como también la intensidad media de fluorescencia (IMF) para GFP, como parámetro de cuánta bacteria fue internalizada por los PMN. Como podemos ver en la **Figura 10**, la opsonización con anticuerpos naturales (Kp-HS) aumentó tanto el porcentaje de PMN que fagocitaron a la bacteria, así como también la cantidad de bacteria internalizada por PMN. Este resultado nos refleja que, más allá de los niveles de opsonización de Kp, la presencia de anticuerpos naturales favorece la internalización de Kp por parte de los PMN.

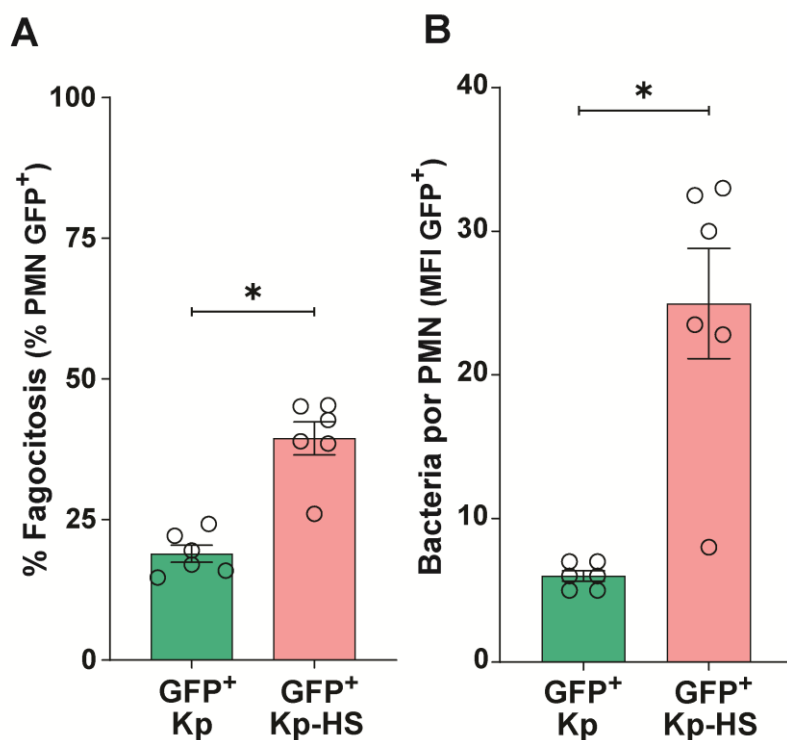


Figura 10. La pre-incubación con HS potencia la fagocitosis de Kp por parte de los PMN. Se pre-incubó GFP⁺-Kp con HS por 30 min (GFP⁺ Kp-HS) y se estimularon PMN humanos purificados durante 30 minutos más. Por citometría de flujo se determinó el % Fagocitosis, a partir de los PMN positivos para GFP (A) un número relativo de bacteria por PMN, según la intensidad media de fluorescencia (MFI) por PMN (B). Cada punto representa un dador de PMN. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

A continuación, con el fin de seguir indagando el efecto de los anticuerpos naturales en la respuesta del PMN frente a Kp, nos propusimos determinar la producción de ROS para Kp-HS. Si Kp-HS presenta una mayor fagocitosis podríamos hipotetizar que Kp-HS inducirá una mayor producción de ROS. Para evaluar esta función, pre-incubamos PMN purificados con la sonda intracelular DHR, capaz de aumentar su fluorescencia en presencia de ROS. Luego incubamos los PMN por 30 minutos con Kp o Kp-HS y determinamos el % de PMN positivos para DHR como parámetro de producción de ROS, por citometría de flujo. Tal como esperábamos, Kp-HS indujo una mayor producción de ROS en los PMN (**Figura 11**).

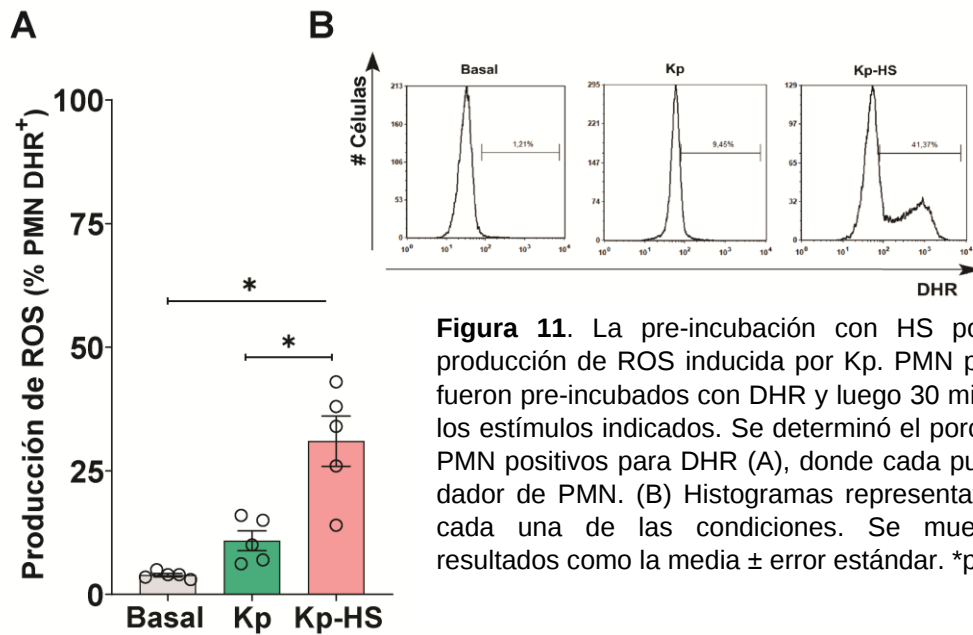


Figura 11. La pre-incubación con HS potencia la producción de ROS inducida por Kp. PMN purificados fueron pre-incubados con DHR y luego 30 minutos con los estímulos indicados. Se determinó el porcentaje de PMN positivos para DHR (A), donde cada punto es un dador de PMN. (B) Histogramas representativos para cada una de las condiciones. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

Volviendo a la pregunta principal, donde buscamos responder si los PMN serían capaces de liberar NETs frente al encuentro con Kp gracias a la presencia de anticuerpos naturales, podemos pensar que un aumento en la fagocitosis y la producción de ROS frente a Kp podrían ser suficientes para gatillar la formación de NETs. Por lo tanto, bajo las mismas condiciones, evaluamos la formación de NETs utilizando Kp-HS a las 3 horas, a partir de la determinación de ADN y MPO liberados.

Sin embargo, como podemos observar en los gráficos de la **Figura 12**, tanto en la liberación de ADN como en la actividad MPO, Kp-HS continúa siendo incapaz de inducir NETs *per se* y además mantiene su capacidad inhibitoria frente a las NETs inducidas por PMA. Sorprendentemente, este resultado nos refleja que la producción de ROS no sería suficiente para inducir la formación de NETs, en presencia de Kp.

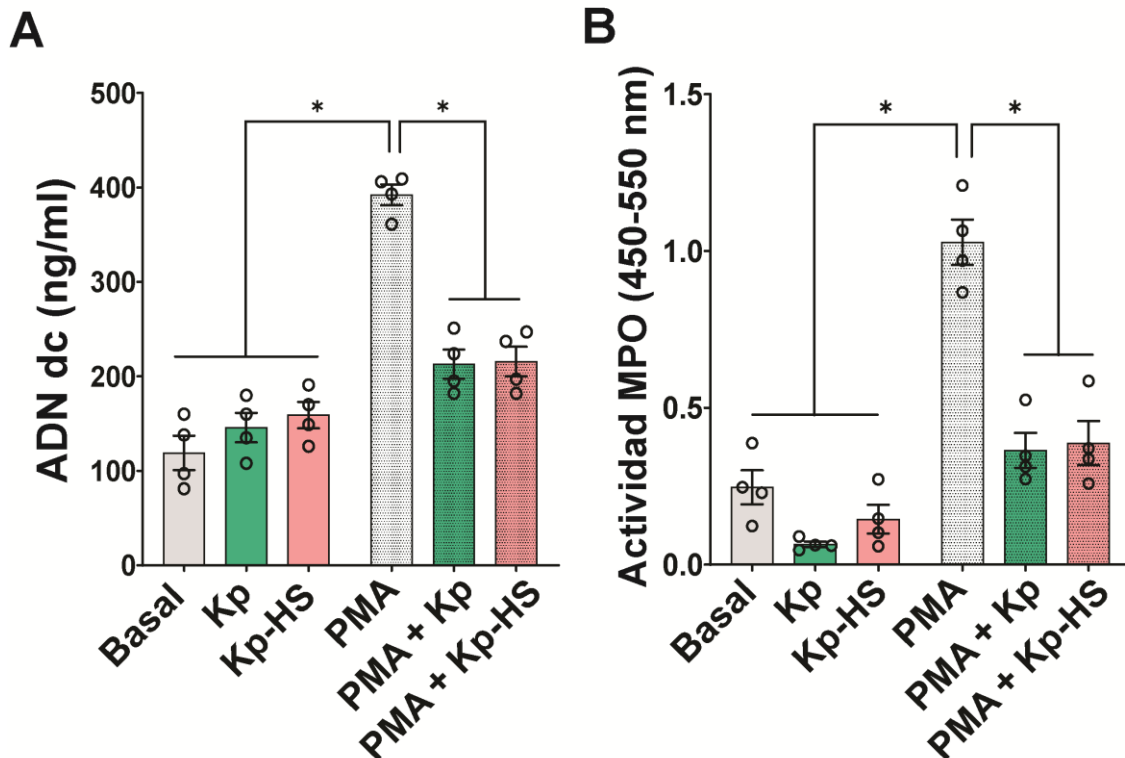


Figura 12. La presencia de anticuerpos naturales no modula la falta de NETs. Se incubaron PMN purificados con los estímulos indicados por 3 horas. Se determinó la formación de NETs a través de la cuantificación de ADN doble cadena liberado al sobrenadante (A) y de la actividad de la proteína mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes (B). Cada punto representa un dador de PMN, se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

Finalmente, quisimos evaluar si estos cambios en la respuesta del PMN frente a Kp podrían verse reflejados en la sobrevivencia de la bacteria. Entendiendo que los principales cambios ocurrieron en mecanismos microbicidas intracelulares, mientras que no observamos diferencias en las NETs y la liberación de MPO (mecanismos extracelulares), decidimos evaluar la capacidad de eliminación de la bacteria intracelular, luego de 1 hora de incubación. Para esto, incubamos PMN purificados con Kp o Kp-HS por 1 hora, eliminamos la bacteria extracelular y adherida utilizando colistina, y sembramos diluciones seriadas en placas de TSA. Al día siguiente, realizamos el recuento de UFC para determinar la sobrevivencia intracelular. Como podemos observar en la **Figura 13A**, el número de UFC recuperado para Kp y Kp-HS fue el mismo, haciéndonos pensar que la capacidad de eliminación no se modificó. Sin embargo, debemos recordar que Kp-HS es más fagocitada que Kp, por lo que obtener la misma cantidad de bacteria podría indicarnos, en realidad, que sí aumentó la capacidad

de eliminación intracelular. Bajo esta lógica, si no hubiese modificaciones en el *killing*, deberíamos encontrar más UFC en el caso de Kp-HS, ya que inicialmente ingresó más bacteria. Este razonamiento, con la consecuente disminución de UFC cuando los PMN fueron enfrentados a Kp-HS, se refleja en el gráfico de la **Figura 13B**, donde fue relativizado el número de UFC según la IMF de GFP, un parámetro que refleja cuánta bacteria ingresó por PMN.

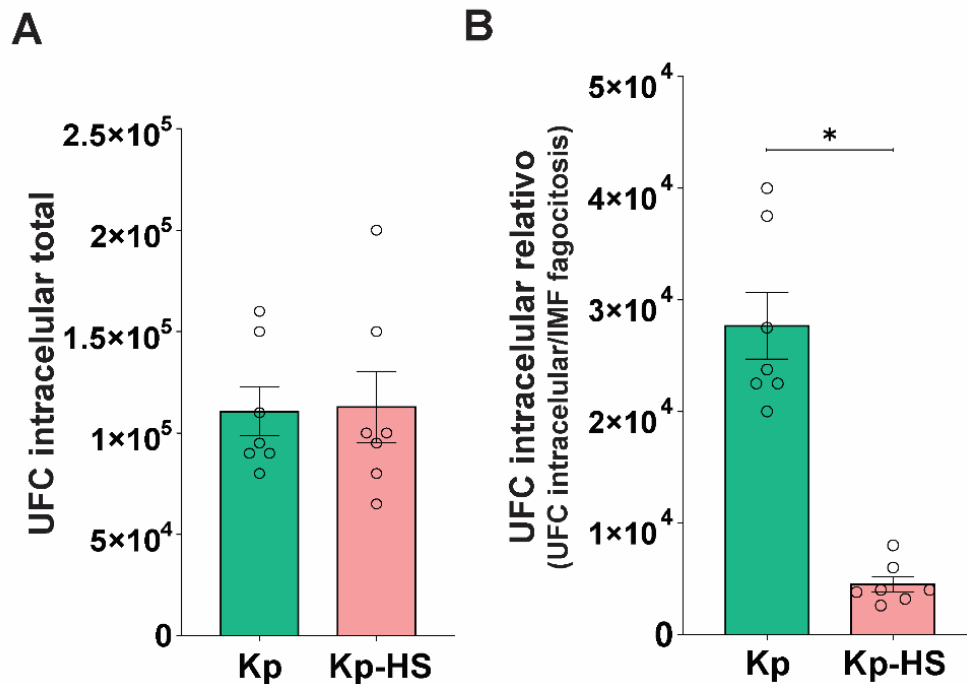


Figura 13. La pre-incubación con HS potencia el *killing* intracelular frente a Kp. PMN purificados fueron enfrentados por 1 hora con Kp o Kp pre-incubada con HS (Kp-HS). Se eliminó la bacteria extracelular con antibiótico, se plaquearon diluciones seriadas en TSA y las UFC fueron contadas al día siguiente. (A) UFC intracelulares totales. (B) UFC intracelulares relativizadas a la IMF de fagocitosis (ver Figura 10). Cada punto representa un dador diferente de PMN. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. *p<0.05.

Como conclusión de esta sección de resultados, podemos decir que la presencia de anticuerpos naturales potencia los mecanismos intracelulares de *killing*, pero no logran modular la falta de liberación de NETs en presencia de Kp.

1.3.2. Las plaquetas se activan frente a Kp, pero son incapaces de revertir la falta de NETs

Las plaquetas (PLT) constituyen otro componente relevante presente en la circulación sanguínea. No sólo son importantes para la coagulación, sino que también hay vasta evidencia de su importante rol en el transcurso de la respuesta inmune ¹⁹⁹. En particular, focalizando en su interacción con los PMN, es necesario recordar que las PLT al activarse son capaces de formar agregados y potenciar la respuesta microbiciada de los PMN ²⁰⁰.

Con el objetivo de seguir investigando la respuesta del PMN en contextos más fisiológicos, estudiamos el rol de las PLT en la interacción de los PMN con Kp. Para esto, purificamos PLT a partir de las mismas muestras de sangre donde fueron purificados los PMN y realizamos ensayos incubando PLT con Kp, así como también co-incubaciones de PMN, PLT y Kp. En primer lugar, quisimos dilucidar si las PLT eran capaces de interactuar con la bacteria y si la bacteria sería capaz de activar a las PLT, lo cual constituye uno de los primeros pasos claves para poder luego potenciar la respuesta del PMN. PLT purificadas fueron incubadas por 30 minutos con distintas relaciones de Kp y por citometría de flujo determinamos la unión de Kp a las PLT y la activación de las PLT. Para determinar la unión, marcamos las PLT con CD61 (marcador clásico para identificar PLT) y utilizamos GFP⁺ Kp, obteniendo el porcentaje de unión a partir de la población doble positiva PLT (CD61⁺) GFP⁺. Por otro lado, la activación de las PLT fue evaluada utilizando un anticuerpo anti p-selectina, una molécula que aumenta su expresión en membrana cuando las PLT se activan. Determinamos el porcentaje de p-selectina en las PLT postivas para CD61 (CD61⁺).

Como podemos observar en la **Figura 14A**, las PLT son capaces de unirse a la Kp, donde a partir de la relación 1:5 PLT:Kp vemos un claro aumento en el porcentaje de PLT GFP⁺. Consecuentemente, la expresión de p-selectina en las PLT aumenta significativamente a partir de la relación 1:5 PLT:Kp (**Figura 14B**), indicando que las PLT son capaces de activarse en respuesta a Kp.

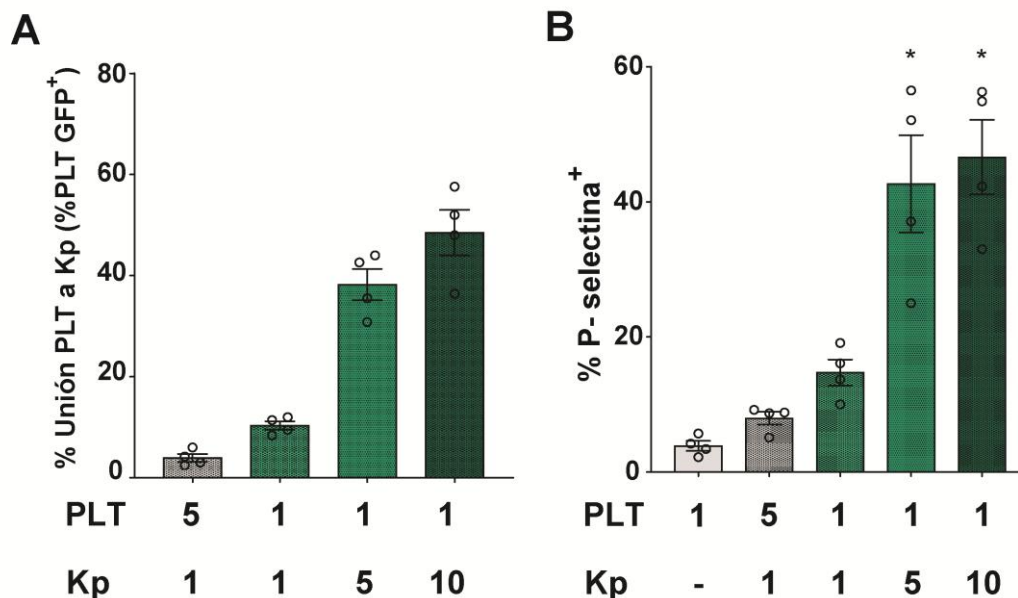


Figura 14. Kp se une y activa a las plaquetas. PLT purificadas fueron incubadas con cantidades crecientes de Kp, según PLT:Kp. Se indica la relación, en modo tabla, de PLT y Kp utilizado en cada caso. (A) Por citometría de flujo se determinó el % de unión de GFP⁺ Kp a las PLT (% CD61⁺ GFP⁺) luego de 30 min de incubación. (B) Por citometría de flujo se determinó el % de activación de las PLT (% CD61⁺ p-selectina⁺) luego de 30 min de incubación. Cada punto representa un dador diferente de PLT. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. *p<0.05 vs PLT solas.

Una vez determinado que las PLT pueden activarse frente a Kp, nos preguntamos si la presencia de PLT activadas podría potenciar las respuestas microbidas de los PMN en presencia de Kp. Para esto, pre-incubamos por 30 minutos a las PLT con Kp, con el fin de activar a las PLT, y luego agregamos a los PMN previamente purificados.

Para este set de experimentos utilizamos una relación PMN:PLT de 1:50 (PLT 50), que se aproxima a la relación fisiológica normal en sangre periférica, y también decidimos mantener, en principio, la relación PMN:Kp 1:10 (Kp 10).

Tal como ya fue descripto, determinamos la producción de ROS por citometría de flujo y la formación de NETs a partir de la medición de ADN y MPO. Como se observa en la **Figura 15**, las PLT *per se*, sin ser previamente activadas, no logran estimular a los PMN. Sin embargo, las PLT pre-incubadas con Kp fueron capaces de aumentar el porcentaje de PMN DHR⁺, reflejando una potenciación en la producción de ROS (**Figura 15A**). Sin embargo, bajo las

mismas relaciones PMN:Kp y PMN:PLT, las PLT no fueron capaces de revertir la falta de NETs en presencia de Kp, como se observa en los niveles de ADN liberados y la actividad MPO (**Figura 15C y 15D**). Este resultado refuerza la idea de que la producción de ROS no sería suficiente para revertir el bloqueo en la inducción de NETs mediado por Kp.

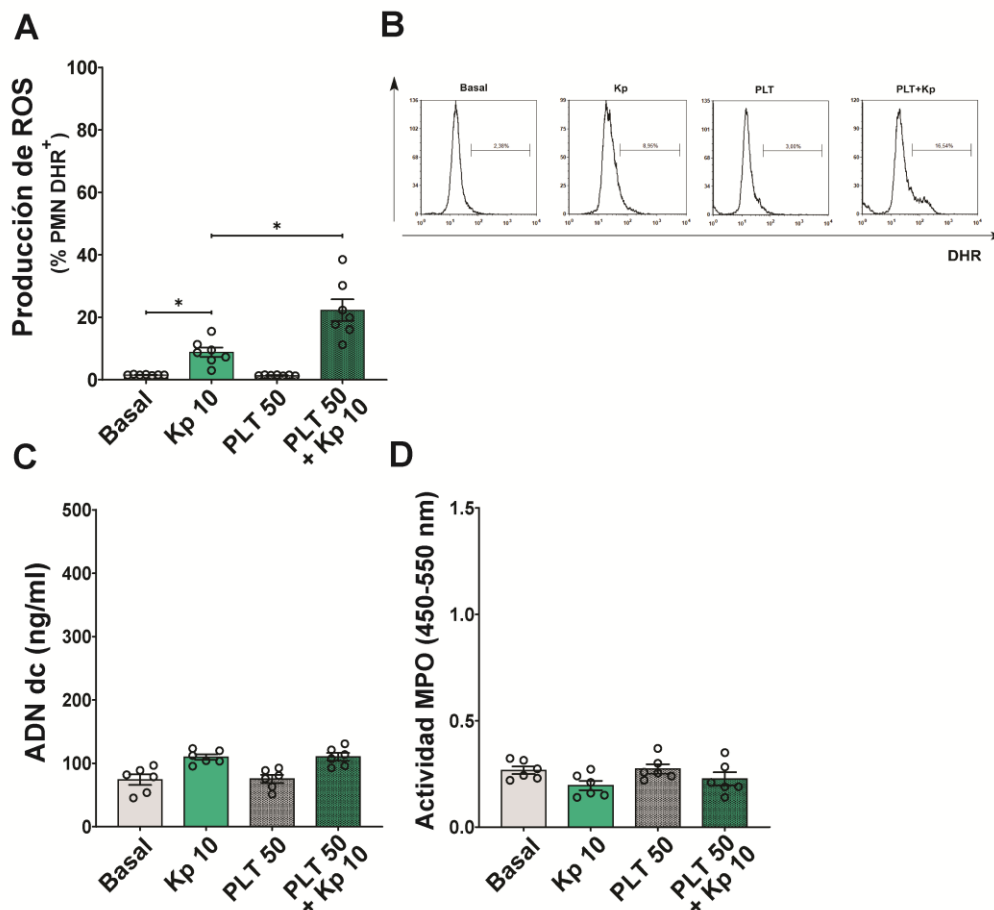


Figura 15. Las PLT en presencia de Kp potencian el ROS, pero no logran inducir la formación de NETs. PMN purificados fueron pre-incubados con DHR y luego 30 minutos con Kp, PLT o ambos (PLT + Kp). (A) Se determinó el porcentaje de PMN positivos para DHR. (B) Histogramas representativos para cada una de las condiciones. Se incubaron PMN purificados de sangre periférica con los mismos estímulos, por 3 horas. Se determinó la formación de NETs a través de la cuantificación de ADN doble cadena (C) y la cuantificación de la actividad de la proteína mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes (D). Cada punto representa un dador de PMN, se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

De todos modos, es necesario hacer una salvedad: se encuentra reportado que es necesaria la activación de las PLT para potenciar la respuesta de los PMN, pero, en nuestro sistema, pudimos determinar activación de las PLT a partir de la relación 1:5 PLT:Kp. Al realizar los primeros ensayos de formación de NETs, establecimos una relación fisiológica 1:50 PMN:PLT y mantuvimos la

relación 1:10 PMN:Kp. De esta manera, por 1 neutrófilo tendríamos 50 PLT y 10 Kp, pero esto implica una relación PLT:Kp de 5:1, que no conduce a la activación de las PLT. Con el objetivo de mantener la relación entre PLT y Kp tal que estemos seguros de la activación plaquetaria, decidimos repetir los ensayos de formación de NETs respetando la relación de PLT y Kp, a pesar de que represente una relación PMN: Kp completamente por fuera de los rangos utilizados. Por lo tanto, la relación para este ensayo fue 1:50:250 siendo PMN:PLT:Kp (PLT 50 + Kp 250). Como podemos ver en la **Figura 16**, aún una relación 1:250 PMN:Kp (Kp 250) no mostró un aumento estadísticamente significativo en la formación de NETs. Más aún, en presencia de PLT 50 y Kp 250, luego de la pre-incubación de Kp con las PLT para garantizar la activación de las mismas, tampoco se indujo la formación de NETs por parte de los PMN. En definitiva, podemos confirmar que las PLT, a pesar de activarse y potenciar la producción de ROS, no son capaces de revertir la falta de NETs en presencia de Kp.

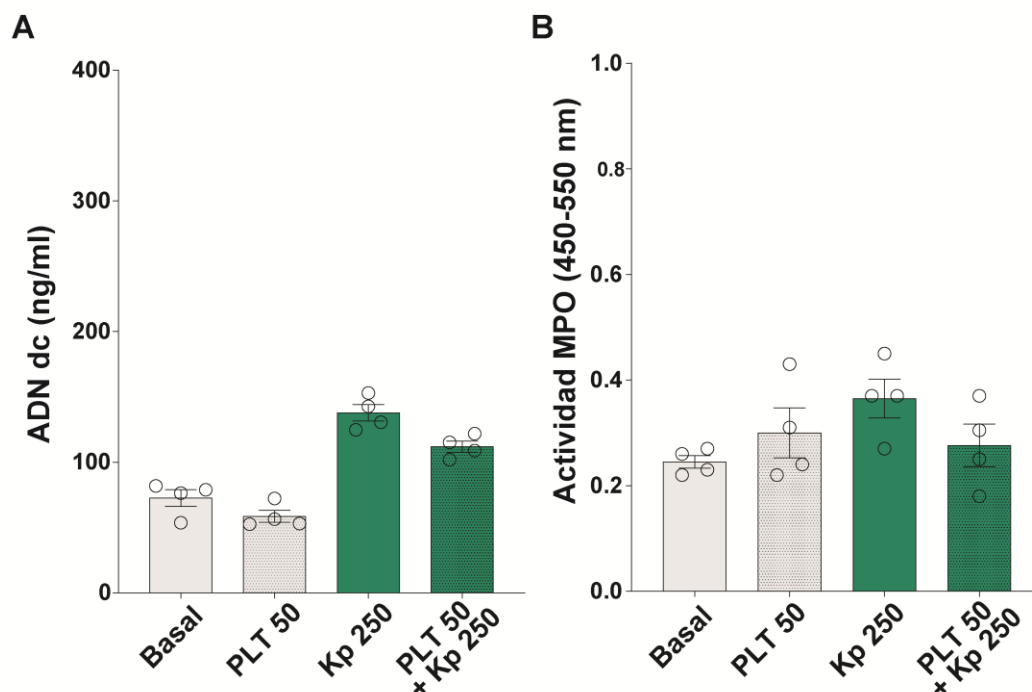


Figura 16. Las PLT no revierten la falta de NETs aún en condiciones óptimas de activación. PLT purificadas fueron pre incubadas con Kp en una relación 1 PLT: 5 Kp por 30 minutos. Se incubaron PMN purificados de los mismos dadores que las PLT con los estímulos indicados por 3 horas. Se determinó la formación de NETs a través de la cuantificación de ADN doble cadena (A) y la cuantificación de la actividad de la proteína mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes (B). Cada punto representa un dador de PMN, se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

1.3.3. Kp no induce la formación de NETs en sangre entera

Finalmente, para comprender si las respuestas observadas tanto en presencia de anticuerpos naturales como de PLT se potenciarían en un contexto fisiológico más complejo aún, decidimos evaluar la producción de ROS y la formación de NETs frente a Kp directamente en sangre entera. En este caso, cabe aclarar que no sólo los PMN junto con anticuerpos naturales y PLT estarán presentes, sino también todas las poblaciones celulares de sangre periférica. Para ello, contamos los PMN presentes en sangre para incubar con Kp respetando la relación 1:10 PMN:Kp (Kp) e incubamos los tiempos indicados para determinar la producción de ROS (pre-incubación con DHR y citometría de flujo) y la medición sólo de ADN como parámetro de formación de NETs, dado que otras peroxidasas presentes en el plasma interfieren en la determinación de la actividad MPO. Para tener un parámetro de respuesta efectiva de los PMN en sangre entera, utilizamos nuevamente a Eco. Como podemos ver en los gráficos de la **Figura 17**, Eco aumenta significativamente la producción de ROS y la liberación de ADN. Sin embargo, tal como observamos en presencia de anticuerpos naturales y PLT, en presencia de Kp hay un aumento en la producción de ROS por parte de los PMN en sangre entera, pero no es posible revertir la falta de NETs.

Estos experimentos, en su conjunto, refuerzan los resultados obtenidos sobre el impacto de Kp sobre la formación de NETs en PMN purificados. Ningún componente presente en sangre entera, modelando el microambiente donde naturalmente los PMN responden, fue capaz de revertir la falta de NETs en presencia de Kp, a pesar de potenciarse otras respuestas efectoras del PMN.

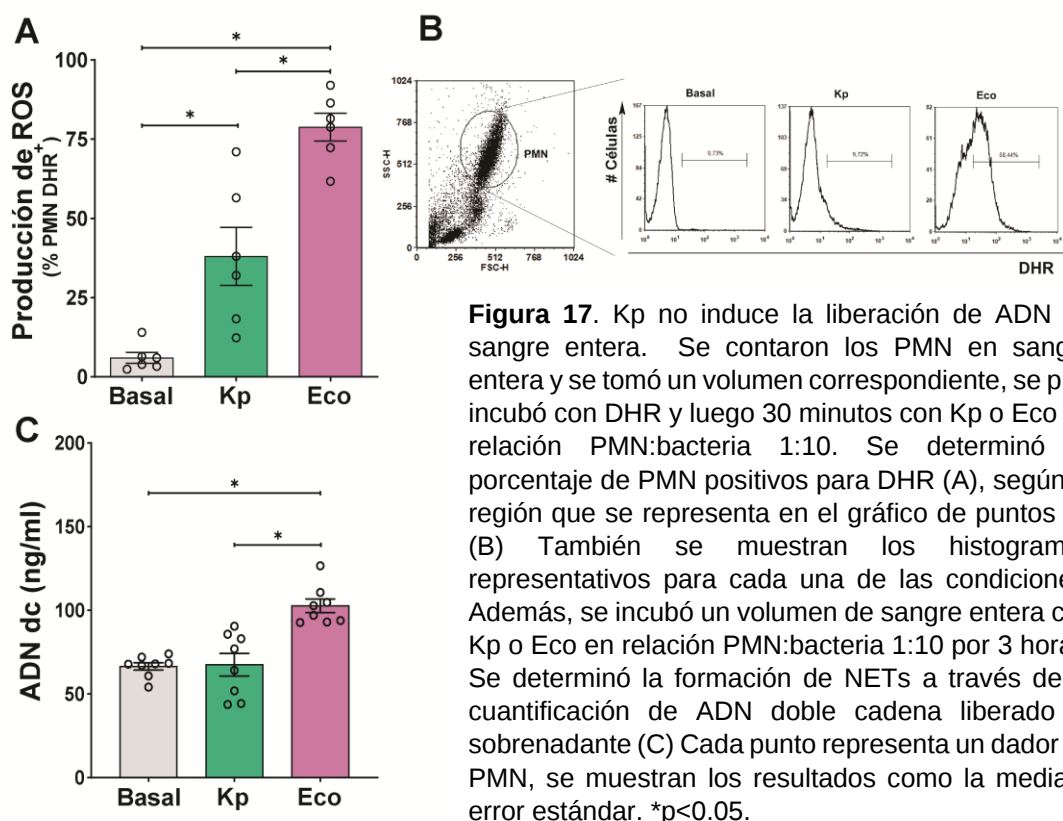


Figura 17. Kp no induce la liberación de ADN en sangre entera. Se contaron los PMN en sangre entera y se tomó un volumen correspondiente, se pre-incubó con DHR y luego 30 minutos con Kp o Eco en relación PMN:bacteria 1:10. Se determinó el porcentaje de PMN positivos para DHR (A), según la región que se representa en el gráfico de puntos en (B) También se muestran los histogramas representativos para cada una de las condiciones. Además, se incubó un volumen de sangre entera con Kp o Eco en relación PMN:bacteria 1:10 por 3 horas. Se determinó la formación de NETs a través de la cuantificación de ADN doble cadena liberado al sobrenadante (C) Cada punto representa un dador de PMN, se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

1.4. Dilucidar el impacto de Kp sobre los pasos necesarios para la formación de NETs

1.4.1. Kp inhibe la formación de NETs aún en presencia de ROS

Nuestro grupo se encuentra estudiando la respuesta del PMN frente a Kp hace algunos años y hemos reportado que Kp no sólo es una pobre inductora de la producción de ROS, sino que también es capaz de inhibir la producción de ROS gracias a un componente de pared ⁹. Tal como se mencionó, la formación de NETs NOX-dependientes requiere de la producción de ROS como un primer paso fundamental y necesario para dar lugar finalmente a la liberación de NETs. En este sentido, es plausible pensar que Kp está afectando la formación de NETs al disminuir la producción de ROS. Por lo tanto, más allá de los indicios que observamos en presencia de anticuerpos naturales y PLT, nos propusimos abordar directamente la pregunta estudiando los casos donde observamos inhibición de las NETs NOX-dependientes. Entonces, pre-incubamos PMN purificados durante 15 minutos con la sonda DHR y luego otros 30 minutos a 37°C con 5% CO₂ junto con PMA o Eco (en una relación PMN:bacteria 1:1), en

presencia o ausencia de Kp (en una relación PMN:bacteria 1:10). Por citometría de flujo determinamos el % PMN DHR⁺, como parámetro del número de PMN productores de ROS.

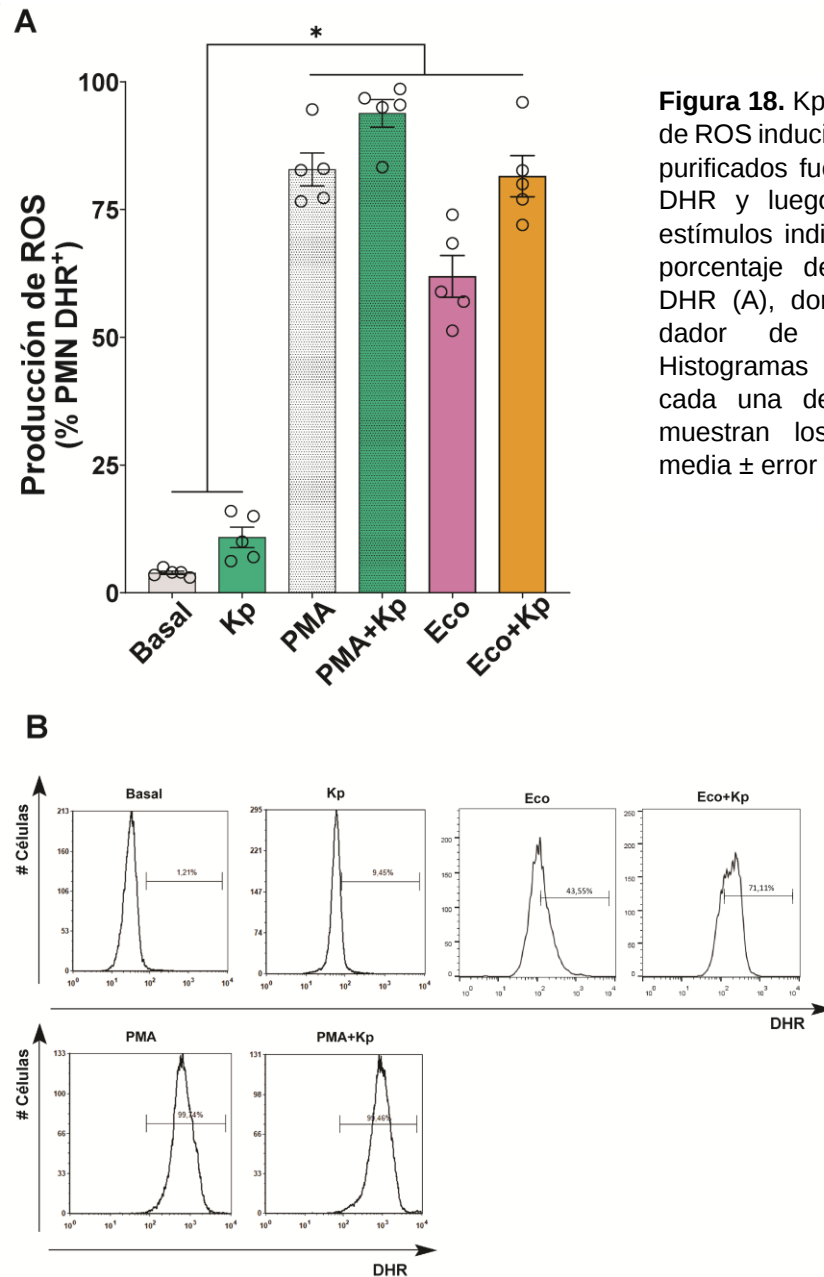


Figura 18. Kp no afecta la producción de ROS inducida por PMA o Eco. PMN purificados fueron pre-incubados con DHR y luego 30 minutos con los estímulos indicados. Se determinó el porcentaje de PMN positivos para DHR (A), donde cada punto es un dador de PMN distinto. (B) Histogramas representativos para cada una de las condiciones. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$

Como podemos ver en la **Figura 18**, Kp induce una leve producción de ROS con respecto a un basal, mientras que Eco y PMA son fuertes inductores. A su vez, la presencia de Kp en ninguno de los casos redujo la producción de ROS inducida por Eco y PMA. Más aún, se observa una leve tendencia hacia el aumento en la producción de ROS cuando Kp está presente junto a Eco o PMA. Esto nos permite confirmar que Kp es capaz de inhibir la formación de NETs aún

en presencia de una fuerte producción de ROS, lo cual sugiere que su efecto inhibitorio debería encontrarse río debajo de este fenómeno, es decir en un punto posterior a la generación de ROS.

1.4.2. La elastasa no es capaz de migrar desde los gránulos azurófilos hacia el núcleo

La elastasa del neutrófilo (NE, por sus siglas en inglés), junto con las proteínas presentes en los gránulos azurófilos de los PMN, cumplen un rol fundamental para las funciones microbicidas. No sólo se movilizan hacia los fagosomas para mediar la muerte intracelular, sino que también se movilizan hacia la membrana plasmática (durante la degranulación) y son importantes mediadores de la formación de NETs, dando lugar a la muerte extracelular de los patógenos. En este sentido, fue reportado que, durante el proceso de formación de NETs inducidas por PMA, en un paso posterior a la producción de ROS, la elastasa debe migrar desde los gránulos azurófilos hacia el núcleo. Allí permite la descondensación del ADN que luego da lugar a la ruptura de la membrana plasmática y la posterior liberación de la NET ⁶³. Entonces, nos preguntamos si Kp podría tener un impacto en la llegada de la elastasa hacia el núcleo.

Siguiendo la temporalidad reportada en el trabajo donde se describen estos pasos necesarios para la formación de NETs ⁶³, incubamos por 60 minutos a los PMN purificados con Kp, en presencia de PMA o Eco como inductores de NETs y determinamos la presencia de elastasa en el núcleo por microscopía confocal. A diferencia del protocolo utilizado para cuantificar NETs por microscopía, se realizó una marcación intracelular, con los mismos reactivos, para lograr observar si la elastasa se encontraba en el citoplasma o en el núcleo. Se cuantificó el número de PMN con elastasa en el núcleo, el número de PMN totales y se calculó el porcentaje de PMN con elastasa nuclear.

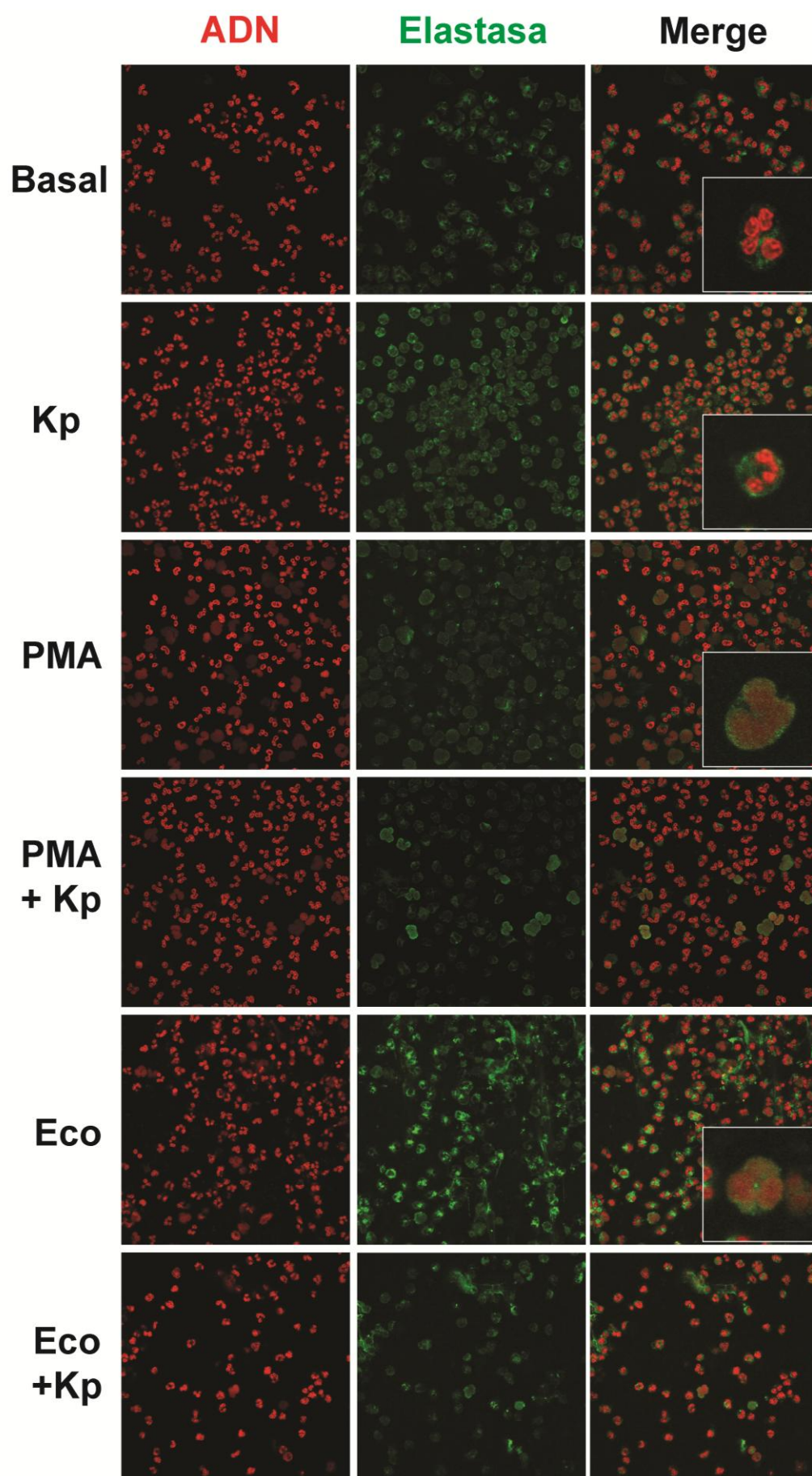


Figura 19. Imágenes representativas de la migración de elastasa al núcleo para los distintos estímulos. PMN purificados fueron colocados suavemente sobre un vidrio dentro de una placa de 24 wells. Se incubó 60 minutos con los estímulos indicados, se fijaron las células y se marcaron para ADN (rojo) y elastasa (verde). Se tomaron 10 campos por condición en 1000x y se muestra una célula representativa del fenómeno (5000x).

En la **Figura 19** se muestran las fotos representativas de cada condición y en la **Figura 20** la cuantificación correspondiente. Podemos ver que la incubación con Kp no induce un aumento en el porcentaje de PMN con elastasa nuclear (sin diferencias vs el basal), en línea con la falta de NETs, mientras que con PMA o Eco hay un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de PMN con elastasa nuclear. Sorprendentemente, la presencia de Kp logró disminuir significativamente el porcentaje de PMN con elastasa nuclear tanto para PMA como para Eco.

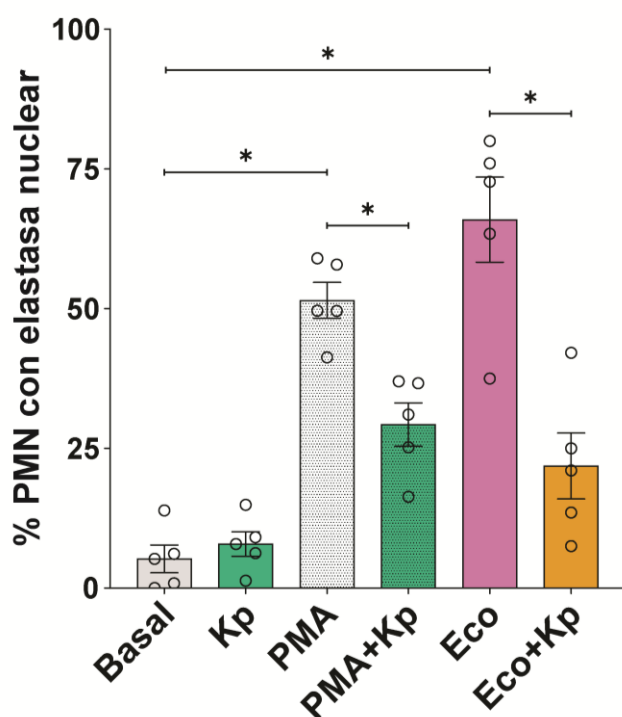


Figura 20. Kp afecta la migración de elastasa al núcleo. A partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal (representativas en la Figura 18), se cuantificó el número de PMN con elastasa en el núcleo por condición. También se determinó el número total de PMN por foto y se calculó el porcentaje de PMN con elastasa nuclear. Cada punto representa un dador de PMN. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$

Sin embargo, es importante considerar que estos resultados también podrían explicarse si Kp presenta un efecto directo sobre la actividad de la elastasa, ya que en el trabajo de Metzler *et al.* se reportó que su actividad era necesaria para la llegada al núcleo desde los gránulos azurófilos. Para descartar esta hipótesis, decidimos incubar sobrenadantes de PMN lisados, como fuente de elastasa, con distintas cantidades de Kp, para luego evaluar la actividad

elastasa utilizando un sustrato específico. Tal como puede observarse en la **Figura 21**, en ninguno de los casos Kp afectó la actividad elastasa.

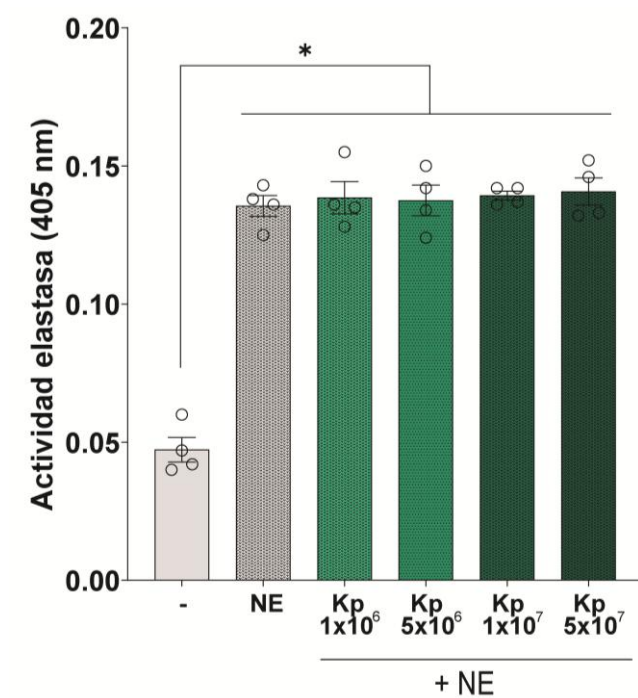


Figura 21. Kp no modifica la actividad de elastasa. Lisados de PMN fueron utilizados como fuente de elastasa (NE). Se incubó NE con cantidades crecientes de Kp durante 1 hora y se determinó la actividad elastasa en los sobrenadantes utilizando un kit comercial. Cada punto representa un dador distinto de PMN a partir del cual se obtuvo el lisado. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$

Estos resultados sugieren que la inhibición de la formación de NETs en presencia de Kp podría asociarse a un defecto en la migración de la elastasa al núcleo, independientemente de la producción de ROS.

En resumen, los resultados de este capítulo evidencian que los PMN son incapaces de contener a Kp extracelularmente, probablemente debido a la falta de inducción de NETs. Más aún, Kp inhibió las NETs inducidas por distintos estímulos positivos como PMA, Eco, Iono y Sau. La falta/inhibición de la formación de NETs por parte de Kp continuó en presencia de PLT y anticuerpos naturales, contextos donde se observó un aumento en la fagocitosis y/o en la producción de ROS. En este sentido, la capacidad de Kp de inhibir la formación de NETs inducidas por varios estímulos nos lleva a pensar en un blanco celular común a las vías involucradas en todos estos estímulos inductores de la formación de NETs. En el caso de las NETs suicidas NOX dependientes, este blanco aún no identificado se debe encontrar río abajo de la producción de ROS y afecta la llegada de la elastasa al núcleo, impidiendo así la descondensación del ADN y la consecuente liberación de las NETs.

CAPÍTULO 2 – Estudio del impacto de Kp sobre la movilización de los gránulos azurófilos

2.1. Kp afecta la movilización de la elastasa hacia los fagosomas que contienen la bacteria

Hasta este punto hemos estudiado la respuesta microbicida extracelular del PMN frente a Kp, haciendo foco en la formación de NETs como principal mecanismo bactericida. De manera interesante, este recorrido nos llevó a postular un defecto en la movilización de la elastasa desde los gránulos azurófilos hacia el núcleo, el cual es un paso fundamental y necesario para la formación de NETs.

La elastasa es una proteína clave en la fisiología del PMN, cumpliendo roles relevantes tanto en la respuesta microbicida intracelular como extracelular. En este sentido, el hallazgo de un defecto en la movilización de elastasa hacia el núcleo nos llevó a pensar en el conjunto de las funciones que cumple en la respuesta del PMN.

Frente al encuentro con un patógeno de vida extracelular que es fagocitado, la fusión de gránulos azurófilos del PMN con el fagosoma, con la consecuente liberación de su contenido, es uno de los principales mecanismos de muerte intracelular. En este sentido, es esperable que el patógeno se encuentre co-localizando con las proteínas que contienen estos gránulos, como por ejemplo la elastasa. Por lo tanto, para seguir comprendiendo el rol de los gránulos azurófilos en la respuesta frente a Kp, nos preguntamos si la elastasa se encontraría en los fagosomas que contienen a Kp. Para responder esta pregunta utilizamos la cepa de Kp que expresa GFP, ya que nos permite identificar por microscopía confocal la localización intracelular de la bacteria. Nuevamente utilizamos a GFP⁺ Eco, para comparar qué ocurre con la elastasa intracelular en la respuesta frente a una bacteria que es eficazmente eliminada. Entonces, incubamos GFP⁺ Eco o GFP⁺ Kp con PMN purificados por 45 minutos, fijamos las células, permeabilizamos y marcamos la elastasa intracelular con un anticuerpo específico. Luego, por microscopía confocal, determinamos cuántas bacterias co-localizaban intracelularmente con la elastasa, con respecto al total

de bacterias internalizadas por los PMN. En la **Figura 22A** podemos observar las imágenes representativas, mientras que en la **Figura 22B** la cuantificación correspondiente.

Sorprendentemente, mientras que Eco presenta un alto porcentaje de co-localización intracelular con la elastasa, acorde con la eliminación de esta bacteria, Kp casi no co-localiza con la elastasa intracelularmente. Más aún, al realizar una co-infección de los PMN con Kp y sólo Eco expresando GFP, pudimos observar que disminuye el porcentaje de co-localización de la elastasa con Eco. Esto refuerza el impacto de Kp sobre la movilización de los gránulos azurófilos, y por ende de la elastasa, hacia los fagosomas que contienen bacteria.

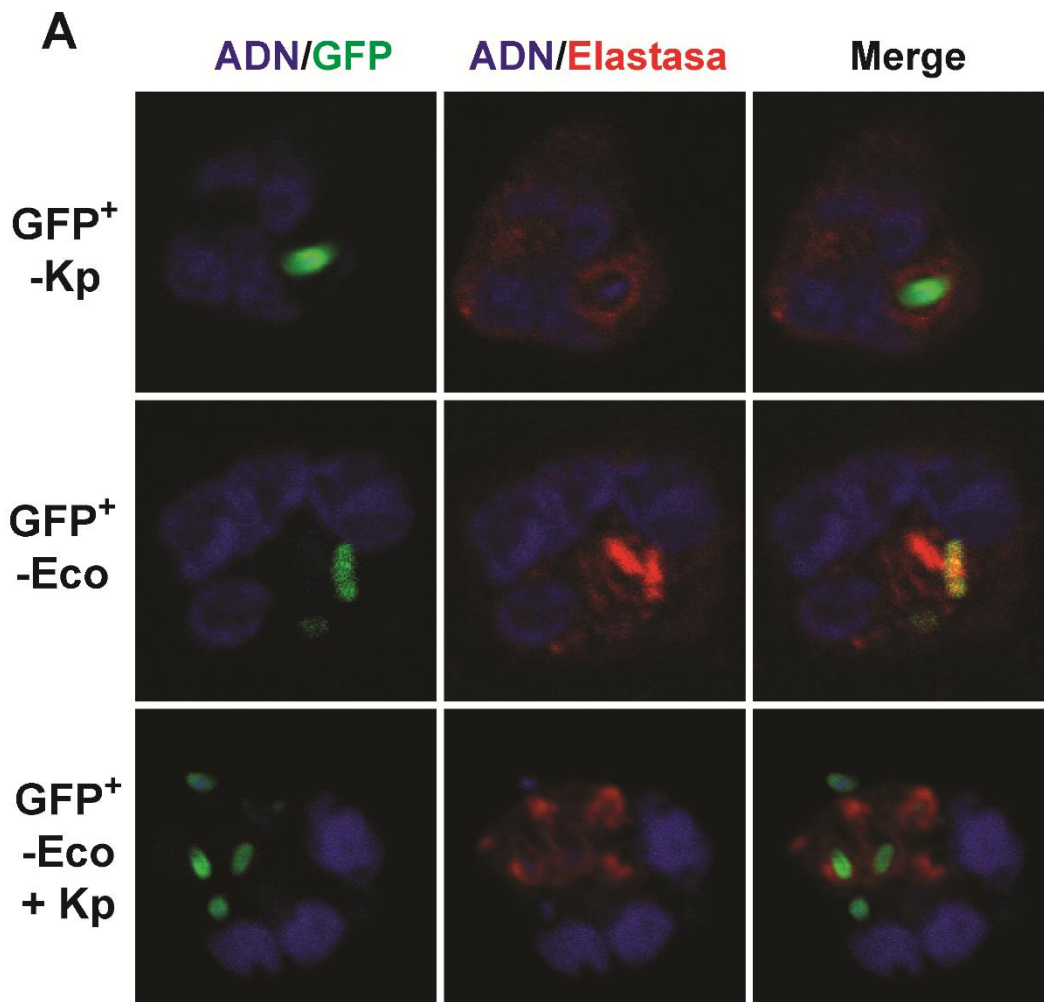


Figura 22. Kp no co-localiza con la elastasa dentro de los PMN. *Continúa en la próxima página.*

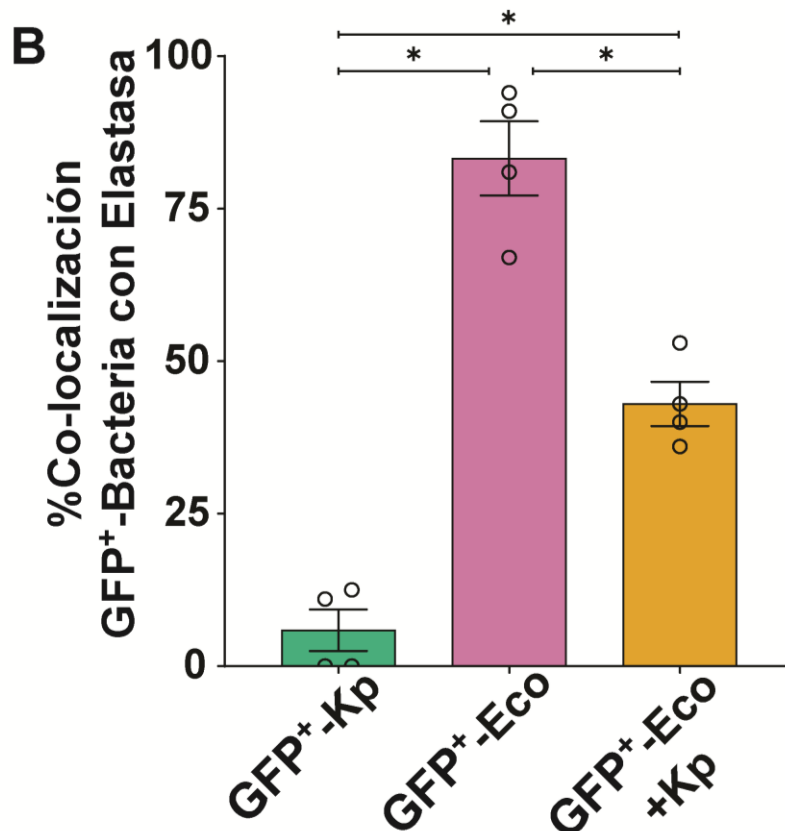


Figura 22. Kp no co-localiza con la elastasa dentro de los PMN. PMN purificados fueron colocados suavemente sobre un vidrio dentro de una placa de 24 wells. Se incubó 45 minutos con GFP⁺ Kp, GFP⁺ Eco o GFP⁺ Eco + Kp los estímulos indicados, se fijaron las células y se marcaron para ADN (azul) y elastasa (rojo). En verde se observan las bacterias GFP⁺. (A) Imágenes representativas de la localización de elastasa intracelular en presencia de bacteria fagocitada (3000x). (B) Cuantificación del número de bacterias intracelulares co-localizando con elastasa, a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal. Cada punto representa un dador distinto de PMN. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

La movilización de la elastasa hacia los fagosomas, sumado a la MPO y la presencia de ROS, debería implicar la posterior muerte del patógeno. Por lo tanto, a partir de la disminución encontrada en el porcentaje de co-localización de Eco GFP⁺ con elastasa, en presencia de Kp, nos preguntamos si podría haber un aumento en la sobrevivencia intracelular de Eco. Para poner a prueba esta hipótesis, incubamos PMN purificados con Eco GFP⁺ en presencia o ausencia de Kp. Luego de 1 hora, eliminamos la bacteria extracelular utilizando antibiótico gentamicina (para el cual Eco es sensible), lisamos los PMN y sembramos en placas con TSA. Al día siguiente, visualizando las placas con luz UV, pudimos cuantificar diferencialmente las colonias GFP⁺, correspondientes sólo a Eco (ver esquema en la **Figura 23A**). En el gráfico de la **Figura 23B** podemos observar

que, en presencia de Kp, aumentó significativamente el número de UFC de Eco GFP⁺, confirmando que la disminución de elastasa en los fagosomas que contienen a Eco se correlaciona con un aumento en la supervivencia intracelular de la bacteria.

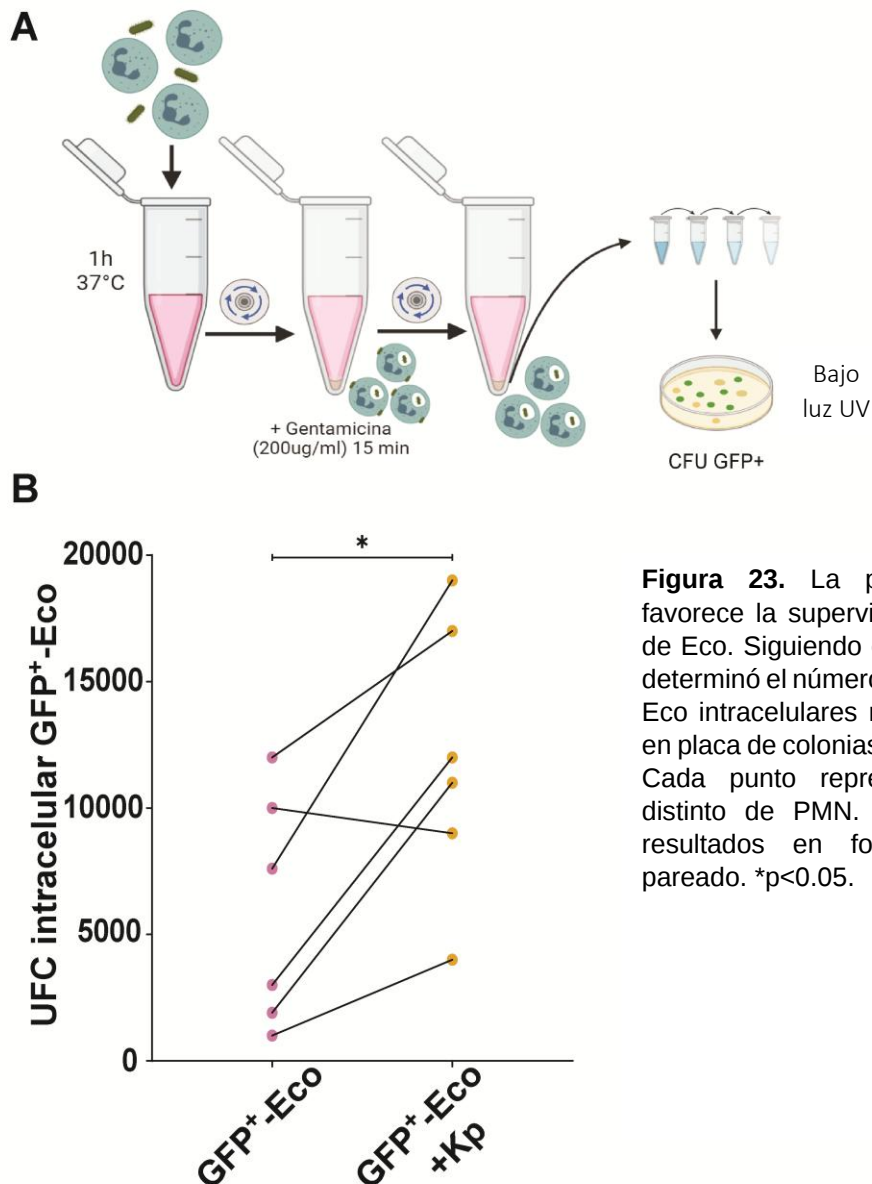


Figura 23. La presencia de Kp favorece la supervivencia intracelular de Eco. Siguiendo el esquema (A) se determinó el número de UFC de GFP⁺-Eco intracelulares mediante recuento en placa de colonias fluorescentes (B). Cada punto representa un dador distinto de PMN. Se muestran los resultados en forma de análisis pareado. *p<0.05.

Estos resultados, en su conjunto, nos relevan que Kp genera un impacto sobre la movilización intracelular de la elastasa que incluso opera en casos de co-infección con una bacteria inductora de la respuesta microbicida, como es Eco.

2.2. Kp afecta la movilización de los gránulos azurófilos hacia la membrana plasmática

La tercera función relevante que cumplen los gránulos azurófilos en la fisiología del PMN es su fusión con la membrana plasmática y consecuente liberación de su contenido al medio extracelular, en un proceso denominado degranulación, donde es capaz de mediar la muerte extracelular de los patógenos. En este proceso, también aumenta la expresión en membrana plasmática de proteínas presentes en la membrana de los gránulos azurófilos, como es CD63.

Con el objetivo de estudiar la degranulación de los azurófilos en respuesta a Kp, decidimos evaluar la expresión en membrana de CD63, un marcador específico de los gránulos azurófilos. Para esto, PMN purificados fueron incubados por 2 horas con Kp o Eco. Luego, con anticuerpos específicos marcamos CD63 y evaluamos su expresión en la membrana plasmática por citometría de flujo. En la **Figura 24** podemos observar el porcentaje de PMN positivos para CD63 y el histograma representativo. Tal como esperábamos, en línea con la falta de liberación de MPO, medido cada vez en los sobrenadantes cuando los PMN se incuban con Kp (Ver **Figuras 3, 6, 7, 8**), los PMN incubados con Kp presentan en su membrana plasmática un porcentaje de expresión de CD63 similar a PMN sin estimular (basal). Por el contrario, Eco aumenta significativamente el porcentaje de PMN positivos para CD63 en su superficie.

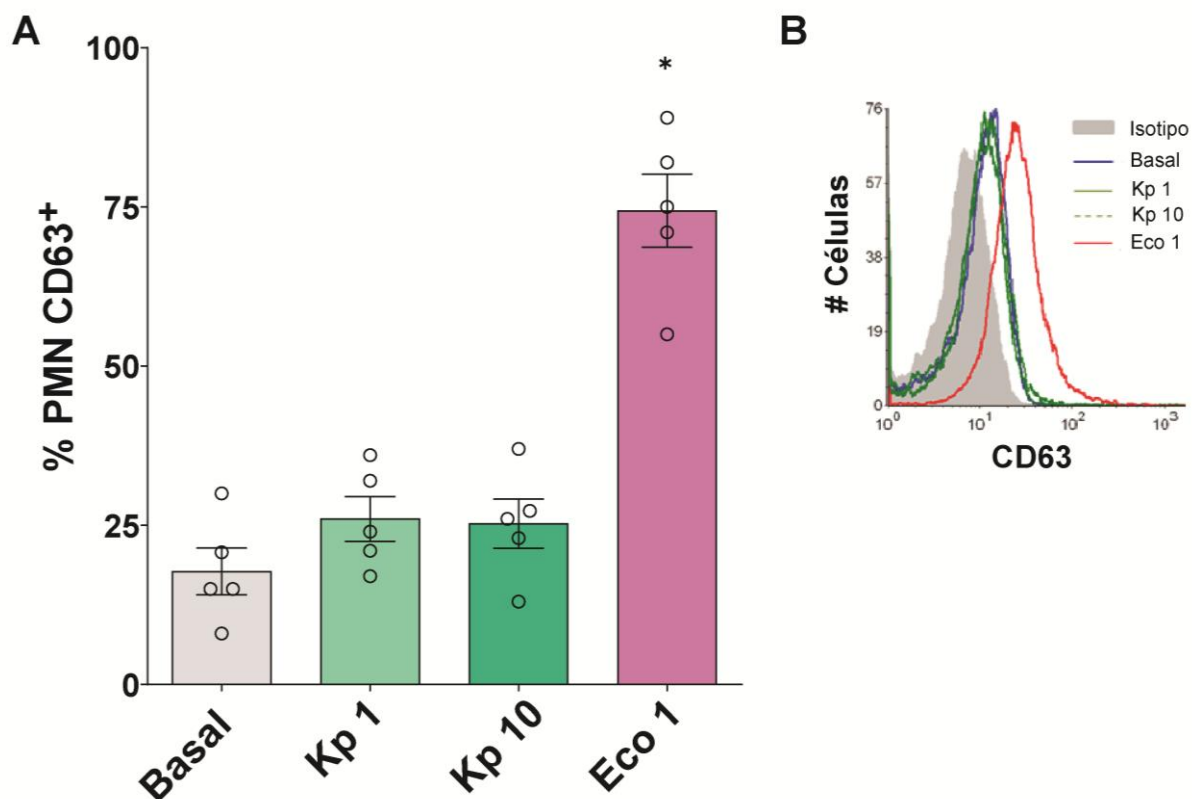


Figura 24. Kp no induce la degranulación de los gránulos azurófilos. PMN purificados fueron incubados por 2 horas con Kp o Eco. Se marcaron las células y se evaluó el porcentaje (%) de PMN positivos para CD63 por citometría de flujo (A), donde cada punto es un dador de PMN distinto. (B) Histogramas representativos para cada una de las condiciones. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$ vs Basal.

El conjunto de estos resultados nos indica que, en presencia de Kp, en los PMN se encuentran afectadas las tres funciones mediadas por la elastasa y la MPO, presentes en los gránulos azurófilos. Observamos que la elastasa no localiza intracelularmente con Kp para mediar su muerte extracelular, ni migra hacia el núcleo para dar lugar a la formación de NETs, así como tampoco ocurre la fusión de los gránulos azurófilos con la membrana plasmática.

2.3. Kp interfiere con la polimerización de actina

El citoesqueleto es la red que gobierna los movimientos intracelulares, así como también los cambios de morfología de la célula, permitiendo las diversas funciones que una célula realiza. Con respecto a los PMN, hay funciones que fácilmente pueden asociarse a un citoesqueleto activo, como son la quimiotaxis y la fagocitosis ^{201,202}. Por otro lado, viejos reportes indican la necesidad del

citoesqueleto para dar lugar a la producción de ROS ^{51,203}. Además del rol de la actina en la movilización de la elastasa hacia el núcleo para dar lugar a la formación de NETs, recientemente se ha reportado que la formación de NETs requiere reordenamientos del citoesqueleto, involucrando la polimerización de actina ⁶⁷, siendo que en presencia de distintos inhibidores del citoesqueleto se afectan las NETs inducidas por PMA.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, los antecedentes que vinculan el citoesqueleto con las respuestas del PMN y la existencia de diversos mecanismos de evasión de patógenos que tienen como target el citoesqueleto ^{82,83}, quisimos indagar si Kp podría impactar en la dinámica del citoesqueleto, como posible mecanismo responsable de los defectos en la movilización de la elastasa y/o los gránulos azurófilos que la contienen.

Para abordar esta pregunta, empezamos analizando qué ocurre con la polimerización de actina en los PMN a lo largo del tiempo al enfrentarse con Kp o Eco, nuevamente como referencia de una respuesta eficaz. Además, decidimos utilizar también al fMLP como estímulo positivo, ya que está bien descrito su impacto en el citoesqueleto. Incubamos PMN purificados de sangre periférica de dadores sanos con Kp, Eco o fMLP por distintos tiempos. Fijamos, permeabilizamos y utilizamos faloidina-TRITC, capaz de unirse a los extremos de actina polimerizada, para determinar la polimerización de actina en el tiempo por citometría de flujo.

En la **Figura 25** se muestra la cinética de polimerización de actina para PMN sin estimular (basal), con Kp o Eco (**Figura 25A**), por un lado, y con fMLP (**Figura 25B**), por el otro. Es interesante destacar que fMLP induce una rápida polimerización de actina, a los 10 segundos, y luego decae, tal como se encuentra descrito ⁶⁷. En presencia de Eco también se observa un aumento en la polimerización de actina, pero recién a los 90 minutos de incubación (razón por la cual se muestran en gráficos distintos, por el eje del tiempo). Sorprendentemente, Kp mostró niveles de actina similares al basal a lo largo del tiempo.

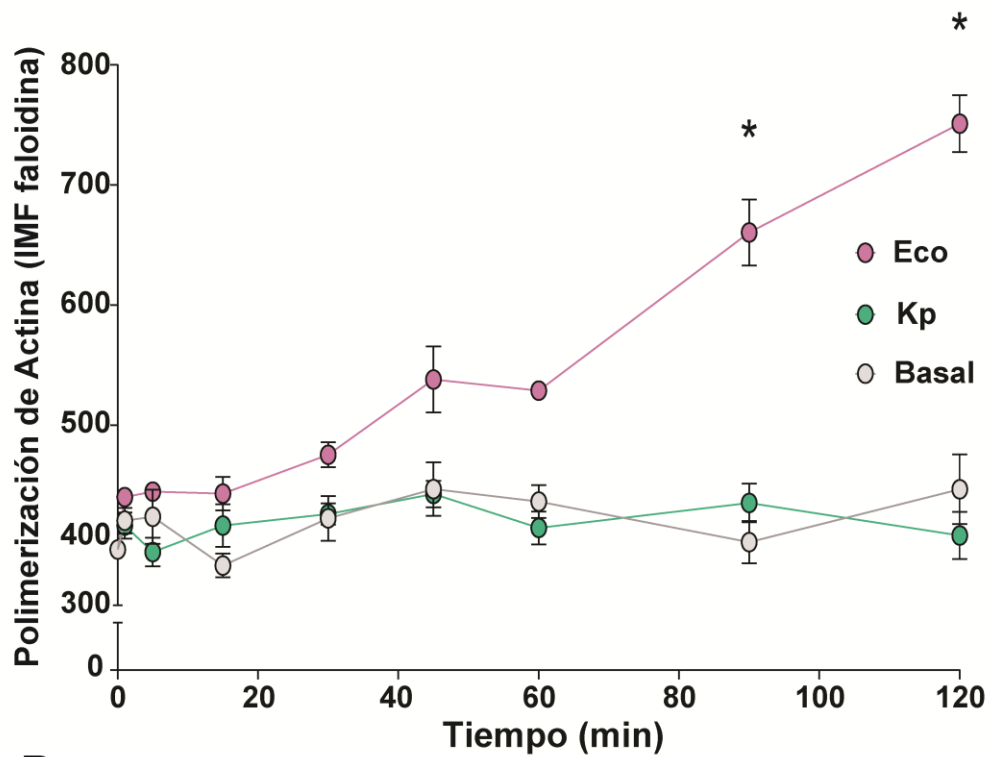
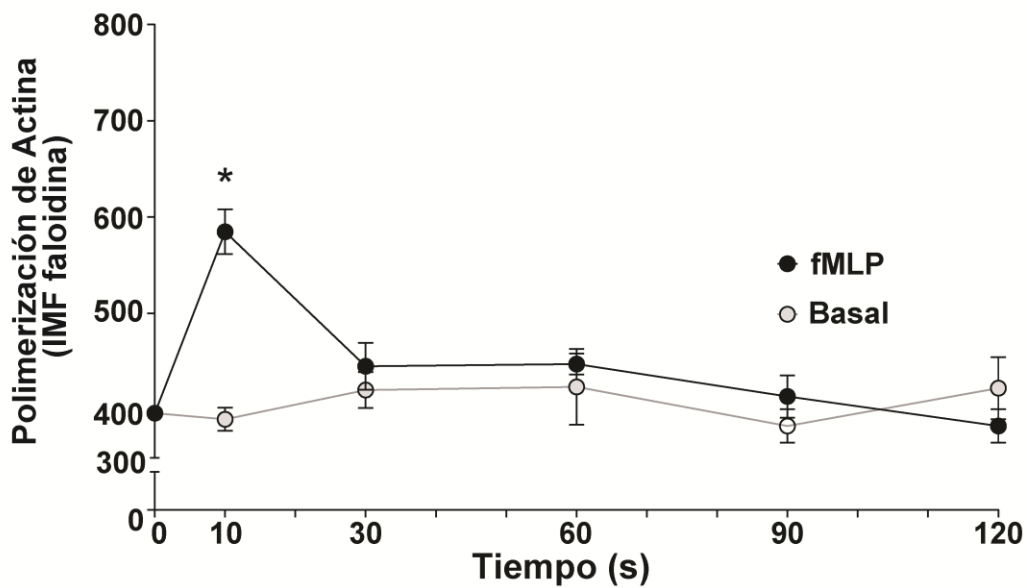
A**B**

Figura 25. Cinética de polimerización de actina para los distintos estímulos. PMN purificados fueron incubados por los tiempos indicados con los estímulos correspondientes. A cada tiempo, las células fueron fijadas y marcadas intracelularmente con faloidina. Por citometría de flujo se determinó la intensidad media de fluorescencia de faloidina como parámetro de polimerización de actina. (A) Polimerización de actina (IMF de faloidina) a lo largo de 120 minutos para Eco (rosa), Kp (verde) y PMN sin estimular (gris). (B) Polimerización de actina (IMF de faloidina) para fmlp (negro) y PMN sin estimular o basal (gris) a distintos tiempos dentro de los 120 segundos (s) post estímulo. Se muestra la media $\pm$ error estándar, con $n = 5$. * $p < 0.05$

Antes de pasar al próximo conjunto de experimentos, es importante comentar un aspecto que hemos concluido a lo largo de estos años de trabajo con Kp. Sabemos que los PMN son atraídos por Kp, son capaces de fagocitarla y activarse, pero luego las respuestas microbicidas mediadas por los gránulos azurófilos se encuentran inhibidas, así como también la liberación de NETs. Esto evidencia un efecto temporal en la dinámica de la inhibición funcional de Kp sobre los PMN, donde las respuestas rápidas están menos afectadas que las respuestas tardías. Así, nosotros creemos que, para lograr establecer ese estado de inhibición en los PMN, se requiere de un tiempo necesario de interacción, donde Kp pone en marcha los factores que median la evasión de las respuestas tardías del PMN. Esta aclaración se ve enmarcada en base a los experimentos que siguen, donde se requirió de una pre-incubación de los PMN con Kp para obtener resultados significativos. Entonces, para evaluar la inhibición de la polimerización de actina por en presencia de Kp, luego de pre-incubar los PMN con Kp por 90 minutos, estimulamos con fMLP por 10 segundos o con Eco por 120 minutos más (donde se vio el máximo de polimerización de actina). En los gráficos de la **Figura 26** se muestran los resultados obtenidos, donde cada punto pareado representa un mismo dador de PMN. Sorprendentemente, tanto cuando el estímulo fue Eco (**Figura 26A**) o fMLP (**Figura 26B**), observamos una disminución significativa de la polimerización de actina, en los PMN pre-incubados con Kp.

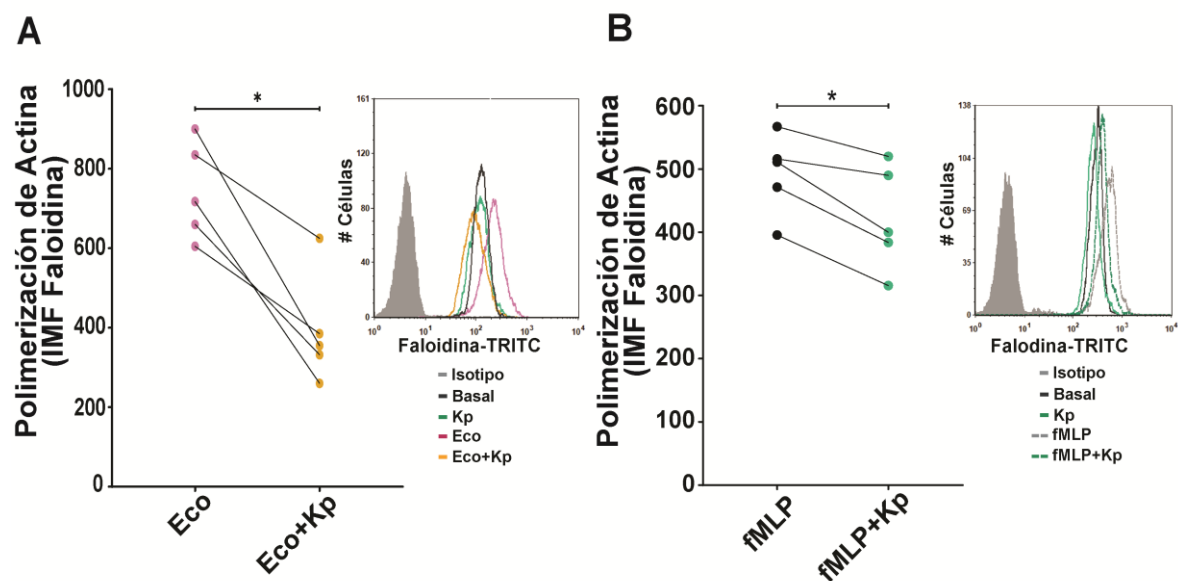
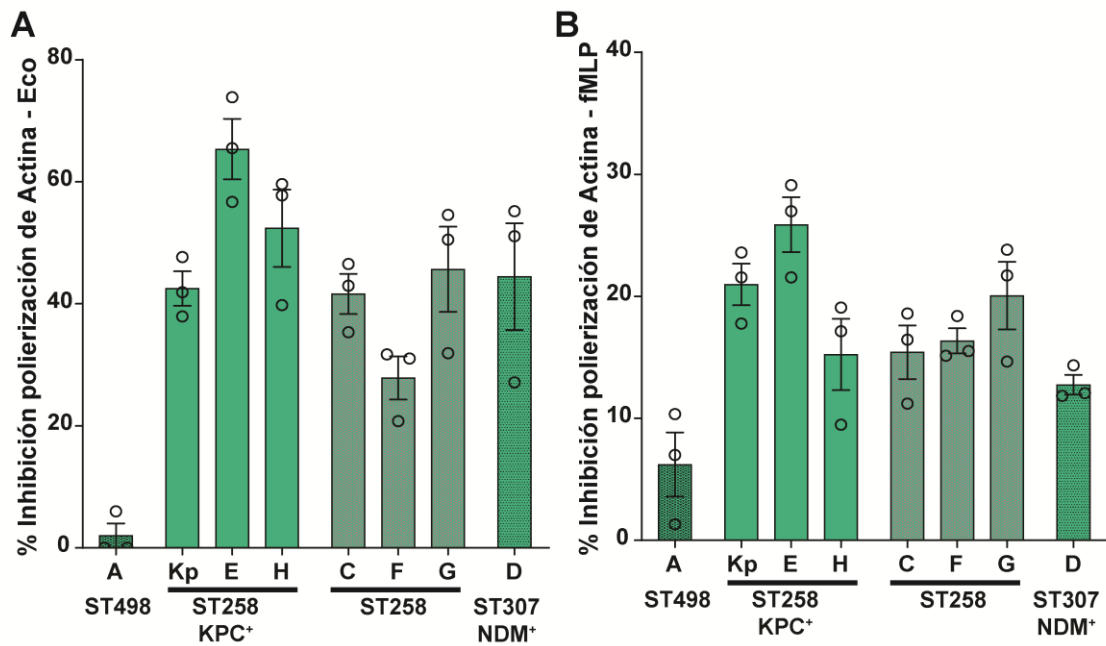


Figura 26. Kp disminuye la polimerización de actina inducida por Eco o fMLP. PMN purificados fueron pre-incubados por 90 minutos con Kp y enfrentados 120 minutos a Eco (A) o 10 segundos a fMLP 1.10^{-7} M (B). Se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de faloidina, representando la polimerización de actina, por citometría de flujo. En ambos casos, se muestran los resultados en un gráfico pareado, junto con un histograma representativo a la derecha. Cada punto representa un dador distinto de PMN. * $p < 0.05$

Una de las desventajas del trabajo con bacterias provenientes de aislados clínicos es la especificidad de los resultados obtenidos: como cada aislado suele tener su evolución particular, puede ser difícil generalizar las observaciones. Dado que previamente pudimos analizar la inhibición de la formación de NETs en diversos aislados o cepas, con el objetivo de dilucidar si el fenómeno era algo compartido por alguna de las características agrupadas de las cepas o algo presente en todas ellas, nos propusimos continuar indagando en los mecanismos detrás de esta estrategia de evasión. Al igual que para Kp, realizamos una pre-incubación de los PMN con cada uno de los aislados y evaluamos la polimerización de actina inducida por Eco o fMLP, mediante citometría de flujo. En los gráficos de la **Figura 27** se puede observar el porcentaje de inhibición de la polimerización de actina para cada aislado. Con excepción del aislado A (ST498), todos los aislados de *Klebsiella pneumoniae* fueron capaces de inhibir la polimerización de actina inducida por Eco (**Figura 27A**). Con respecto a la polimerización de actina inducida por fMLP (**Figura 27B**), todos los aislados menos A y D (ST307) la redujeron. Estos resultados están resumidos en la Tabla de la **Figura 27C**.



C

Aislado	Secuenciotipo (ST)	% Inhibición polimerización de Actina - Eco (media ± SEM)	% Inhibición polimerización de Actina - fMLP (media ± SEM)
A	498	1,99 ± 1,99	6,22 ± 2,64
Kp	258	42,50 ± 2,82 *	20,97 ± 1,71 *
E	258	65,36 ± 4,96 *	25,88 ± 2,25 *
H	258	52,39 ± 6,32 *	15,23 ± 2,30 *
C	258	41,61 ± 3,30 *	15,42 ± 2,19 *
F	258	27,84 ± 3,54 *	16,35 ± 1,03 *
G	258	62,78 ± 8,19 *	20,06 ± 2,77 *
D	307	44,45 ± 8,75 *	12,75 ± 7,99

Figura 27. Distintas cepas de *Klebsiella pneumoniae* afectan la polimerización de actina. PMN purificados fueron pre-incubados por 90 minutos con cada aislado en particular y luego enfrentados 120 minutos a Eco (A) o 10 segundos a fMLP 1.10^{-7} M (B). Para cada aislado se muestra el porcentaje (%) de inhibición. Se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de faloidina por citometría de flujo. Se calculó el porcentaje de inhibición de la polimerización de actina según: $\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Aislado} + \text{Eco/fMLP}}{\text{Eco/fMLP solo}}\right) \times 100$. Cada punto representa un dador de PMN. C. En la tabla se resumen los resultados obtenidos para cada aislado, recordando el ST. Se muestran los resultados como la media ± error estándar. * $p < 0.05$ vs PMN tratados sólo con Eco o fMLP.

Con el objetivo de confirmar nuestro resultado del impacto de Kp en la polimerización de actina, decidimos estudiar qué ocurría con funciones del PMN directamente relacionadas con el citoesqueleto, luego de los 90 minutos de pre-incubación con Kp. Si efectivamente Kp disminuye la polimerización de actina inducida por fMLP y estas funciones dependen directamente de la actina, Kp debería ser capaz de inhibir dichas funciones.

Una de las funciones clásicas del PMN relacionada con el citoesqueleto es la quimiotaxis. Sabemos que, frente a la aparición de un foco infeccioso, distintos factores son liberados, tanto del huésped como del patógeno, que atraen a los PMN al sitio de infección. Este proceso implica una polarización del citoesqueleto para dar lugar a la movilización del PMN siguiendo el gradiente del quimioattractante. Entonces, para evaluar el impacto de Kp sobre la quimiotaxis del PMN, utilizamos una cámara de Boyden. La misma cuenta con un compartimento inferior, donde se coloca el quimioattractante, y uno superior, donde se agregan las células, separados por una membrana porosa que permite el paso de las células sólo si son atraídas (esquema en **Figura 28A**). Primero, realizamos una pre-incubación por 90 minutos de los PMN con Kp. Luego, colocamos RPMI (Basal) o fMLP, un quimioattractante bacteriano, en el compartimento inferior y los PMN, sin estimular o pre-incubados con Kp, en el compartimento superior. Se incubó la cámara de Boyden durante 30 minutos a 37°C, la membrana fue retirada delicadamente y fue teñida para visualizar las células. Utilizando un microscopio óptico se determinó el número de PMN que atravesaron la membrana, es decir que migraron hacia el quimioattractante. Como se puede observar en el gráfico de la **Figura 28B**, el número de PMN migrados disminuyó significativamente cuando éstos fueron pre-incubados con Kp, conforme a la inhibición de la polimerización de actina previamente mostrada.

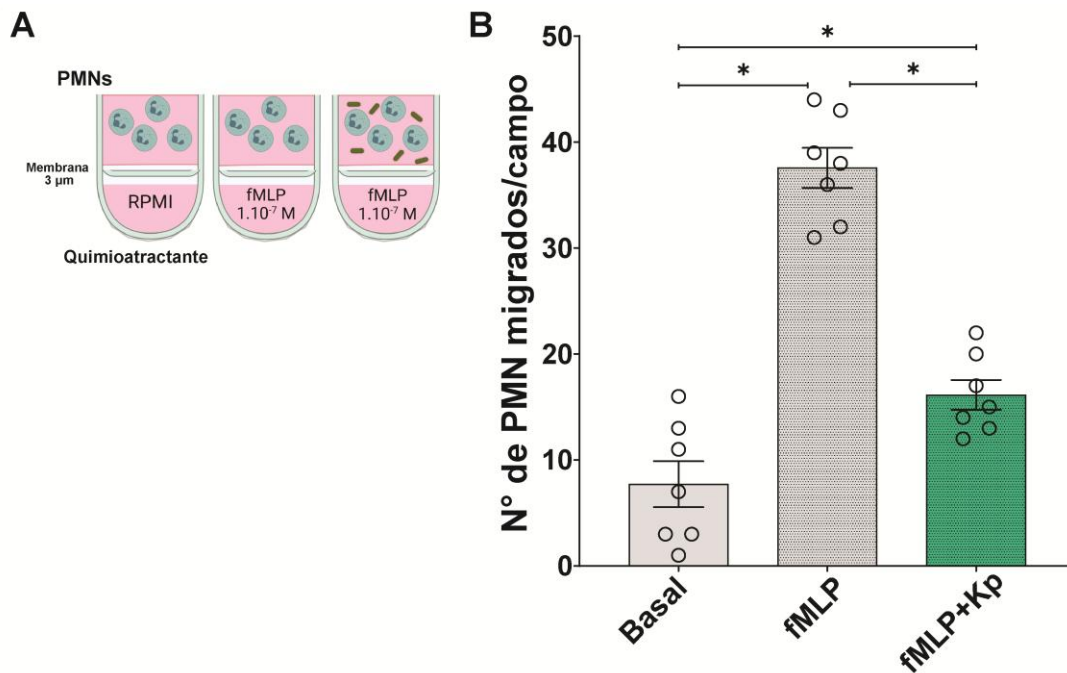


Figura 28. La pre-incubación con Kp reduce la quimiotaxis hacia fMLP. PMN purificados fueron pre-incubados o no con Kp por 90 minutos. (A) Esquema de una cámara de Boyden, donde se colocó RPMI o fMLP como quimioattractante en la cámara inferior. Separados por una membrana, se colocaron los PMN en la cámara superior. (B) Recuento del número de PMN migrados, donde cada punto es un dador diferente de PMN. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

Otra de las funciones del PMN que ha sido relacionada con el citoesqueleto es la producción de ROS. Frente a un estímulo activador ocurre el ensamblado del complejo proteico NADPH oxidasa sobre la membrana del fagosoma, el cual cuenta con cinco sub-unidades. Algunas de ellas se encuentran en el citoplasma, mientras que otras ya están presentes en la membrana del PMN y el correcto funcionamiento del citoesqueleto es necesario para dar lugar al ensamblado de la NADPH oxidasa. Siguiendo el mismo esquema experimental, PMN purificados fueron pre-incubados o no con Kp por 90 minutos, luego se agregó la sonda DHR y finalmente fMLP. De haber producción de ROS, la oxidación del DHR genera un aumento de fluorescencia capaz de ser determinado por citometría de flujo. Como podemos observar en la **Figura 29**, la pre-incubación con Kp disminuyó la producción de ROS inducida por fMLP en todos los casos.

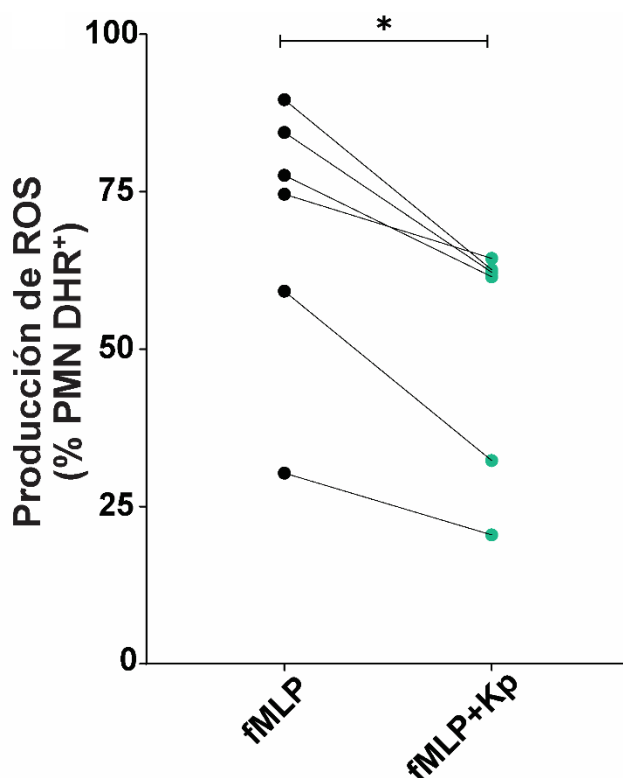


Figura 29. La pre-incubación con Kp reduce la producción de ROS inducida por fMLP. PMN purificados fueron pre-incubados o no con Kp por 90 minutos. Luego, se incubaron 15 minutos con DHR y 30 con fMLP 1.10^{-7} M. Se determinó el porcentaje de PMN positivos para DHR como parámetro de producción de ROS. Los resultados se muestran de manera pareada, donde cada punto es un dador distinto de PMN. * $p < 0.05$.

El conjunto de estos resultados nos indica que Kp, luego de interactuar con los PMN un tiempo adecuado, es capaz de interferir con la polimerización de actina inducida por estímulos positivos. A su vez, este impacto sobre la dinámica del citoesqueleto fue evidenciado a partir del estudio de funciones relacionadas con la polimerización de actina, donde Kp disminuye la quimiotaxis y la producción de ROS, luego de una pre-incubación con los PMN.

2.4. Kp no es eliminada intracelularmente y persiste dentro de los PMN

Existen diversos patógenos con la capacidad de sobrevivir dentro de células relacionadas con la respuesta inmune. Típicamente fue asociado a microorganismos de vida estrictamente intracelular, pero con el correr de los años se describió la capacidad de persistir intracelularmente por parte de algunas bacterias de vida extracelular. Para lograr esto, fueron descriptos distintos mecanismos que involucran alteraciones del tránsito intracelular o bien escape del patógeno al citoplasma. Considerando una respuesta inmune celular convencional, los patógenos, una vez fagocitados, atraviesan un recorrido intracelular que involucra distintos cambios en la composición del fagosoma, los

cuales terminan desencadenando la muerte del patógeno. Este proceso, o maduración de los fagosomas, ocurre gracias a la fusión de diversas vesículas o gránulos al mismo fagosoma, representando los lisosomas la organela más conocida con un potencial microbicida, debido a su rico contenido en proteínas microbidas. Sin embargo, para el caso de los PMN se postula que no poseen lisosomas como tales, pero que los gránulos primarios o azurófilos cumplirían dicha función en estas células. De esta manera, el potencial microbicida de los fagosomas en los PMN estaría directamente relacionado con la fusión de los gránulos azurófilos. En este sentido, la falta de elastasa en los fagosomas conteniendo a Kp (ver Figura 22) nos llevó a preguntarnos qué podría estar ocurriendo dentro del PMN y, en particular, si Kp podría persistir dentro de los PMN, dada la falta de elastasa co-localizando intracelularmente.

Para comenzar a abordar esta pregunta, y en búsqueda de visualizar qué podría estar pasando con Kp que ha sido fagocitada, obtuvimos imágenes de la interacción PMN con Kp por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM, por sus siglas en inglés). El grupo previamente utilizó este abordaje para confirmar la fagocitosis de la bacteria, luego de incubar los PMN con Kp por 1 hora ²⁰⁴. En este caso, con el fin de evaluar qué ocurre a lo largo del tiempo, obtuvimos las imágenes por TEM luego de incubar los PMN con Kp por 3 horas.

En la **Figura 30** podemos ver algunas imágenes representativas de lo que ocurre con Kp dentro de los PMN luego de 3 horas de incubación. Nuevamente, para tener una referencia de cómo se observaría una eficiente respuesta antibacteriana de los PMN, también incubamos a los PMN con Eco, en las mismas condiciones que Kp. Sorprendentemente, podemos observar a Kp casi intacta dentro de los fagosomas (puntas de flecha blancas), mientras que los PMN conservan sus gránulos y no presentan estructuras aberrantes, en comparación con un PMN basal. Más aún, podemos ver que algunas Kp podrían estar incluso dividiéndose (ver asteriscos negros). Por el contrario, el escenario que se observa en presencia de Eco es completamente distinto: no se encuentra ninguna bacteria que conserve su estructura (puntas de flecha negras), los fagosomas que contienen a Eco poseen material electrodensito y los PMN presentan una gran cantidad de vacuolas o fagosomas vacíos. Cabe destacar

que, luego de 3 horas de incubación, la viabilidad de los PMN incubados con Kp es comparable con la de PMN sin estimular (basal), mientras que en presencia de Eco aumenta la muerte de los PMN de manera significativa (% de PMN positivos para ioduro de propidio (media $\pm$ error estándar): Basal = $11,42 \pm 3,16$; Kp = $12,58 \pm 2,21$; Eco = $52,53 \pm 2,95$).

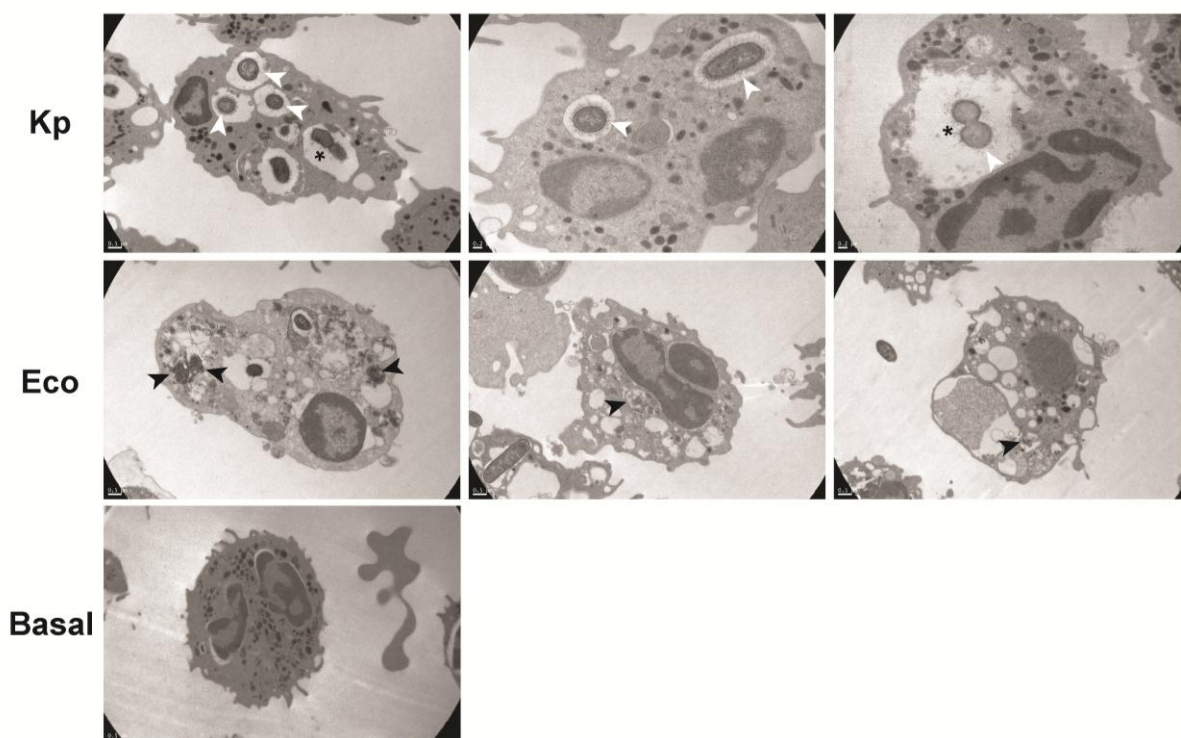


Figura 30. Kp persiste dentro de los PMN luego de 3 horas. PMN purificados se incubaron con Kp (primera fila), Eco (segunda fila) o se dejaron sin estimular (basal) durante 3 horas. Las células fueron fijadas, procesadas y se tomaron fotografías mediante TEM. Se muestran imágenes representativas de bacterias intactas dentro de PMN (puntas de flecha blancas), bacterias parcialmente destruidas (puntas de flecha negras) y eventos de división celular (asterisco negro). La escala (μm) se indica en la esquina inferior izquierda de cada imagen.

La sorpresa que nos generó la observación de Kp dentro de los PMN luego de 3 horas de incubación nos llevó a continuar indagando qué ocurre en el tiempo y, de esa manera, repetir el experimento para observar la interacción PMN-Kp luego de 5 horas de incubación. A este tiempo de incubación decidimos no realizar la comparación con Eco, dado que la muerte de los PMN enfrentados a Eco, para esos tiempos, es casi del 100%. En la **Figura 31** se presentan las imágenes representativas de los PMN incubados con Kp por 5 horas. Al igual que a las 3 horas, podemos observar bacteria dentro del PMN que aún conserva su estructura, así como también PMN que conservan sus gránulos y no presentan estructuras aberrantes.

Kp

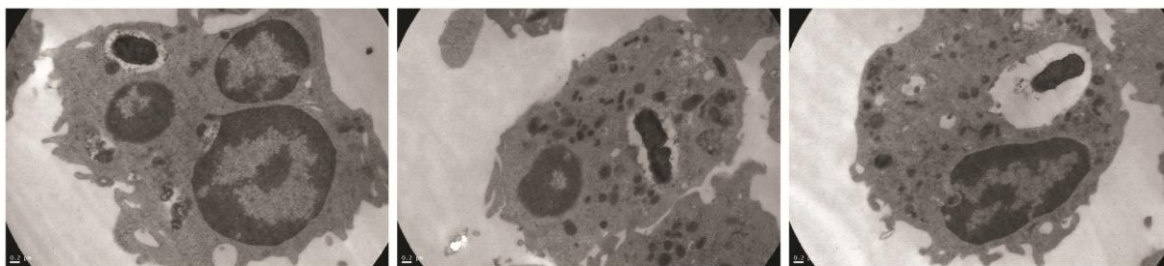


Figura 31. Kp persiste dentro de los PMN luego de 5 horas. PMN purificados se incubaron con Kp 1 hora, se eliminó la bacteria extracelular y se incubó por 4 horas más. Las células fueron fijadas, procesadas y se tomaron fotografías mediante TEM. Se muestran imágenes representativas de bacterias bien conservadas dentro de los PMN. La escala (μm) se indica en la esquina inferior izquierda de cada imagen.

A pesar de que las imágenes de TEM son útiles para observar qué está ocurriendo con el PMN y Kp en el tiempo, permitiendo un mayor entendimiento de la situación, es fundamental investigar si la bacteria efectivamente está viva, para poder confirmar si logra persistir dentro del PMN. Para esto, repetimos las mismas condiciones que en el experimento de TEM: incubamos PMN purificados con Kp por 1 hora, luego eliminamos la bacteria extracelular utilizando antibiótico y dejamos en cultivo a los PMN sólo con la bacteria intracelular por 2 horas y 4 horas más. Finalmente, lisamos las células con agua para liberar las bacterias intracelulares, hicimos diluciones seriadas y sembramos en placas de TSA para cuantificar las UFC intracelulares luego de 3 horas y 5 horas post infección con Kp. Realizamos el mismo protocolo también con Eco, dado que nos parecía importante confirmar que, en esas condiciones, los PMN son capaces de eliminar a una bacteria no evasora. En el gráfico de la **Figura 32** podemos observar el recuento de las UFC intracelulares. En línea con lo reportado a través de las imágenes de TEM, a las 3 horas hay un recuento significativamente mayor de Kp, con respecto a Eco. Más aún, a las 5 horas encontramos una tendencia hacia el aumento en Kp, mientras que el número de UFC de Eco siguió disminuyendo.

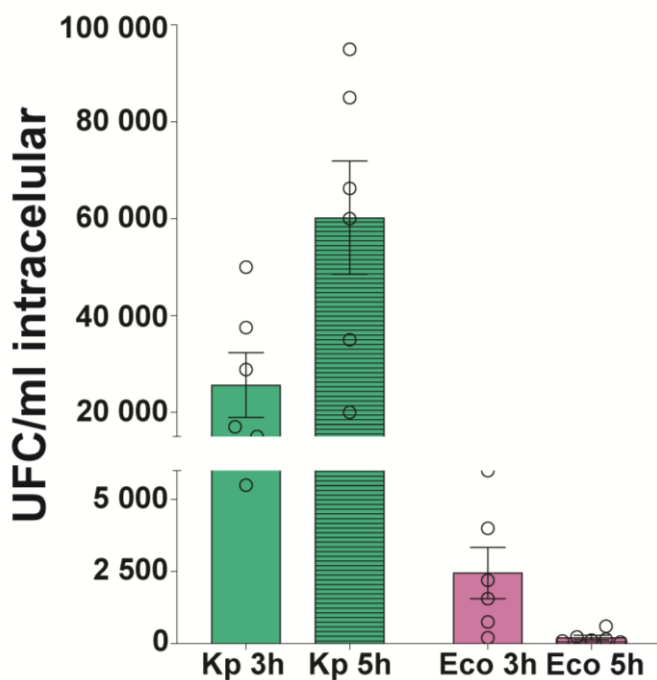


Figura 32. PMN humanos purificados fueron incubados con Kp o Eco por 1 hora y, mediante un tratamiento antibiótico, se eliminaron las bacterias extracelulares. Los PMN con bacterias intracelulares se siguieron incubando durante 2 o 4 horas más. Se lisaron las células, se realizaron diluciones seriadas y se sembró en placas de TSA. Al día siguiente se cuantificaron las UFC y se representan Kp y Eco luego de 3 horas (liso) o 5 horas (rayado) de incubación. Cada punto es un dador diferente de PMN. Se muestran los resultados como la media $\pm$ error estándar. * $p < 0.05$.

En su conjunto, los resultados obtenidos a través de las imágenes de TEM y el recuento de UFC demostrando la viabilidad de la bacteria evidencian que Kp es capaz de persistir hasta al menos 5 horas dentro de los PMN humanos.

Los resultados de este segundo capítulo ponen de manifiesto que Kp interfiere en las distintas funciones microbidas de los gránulos azurófilos. En este sentido, también observamos un impacto en la polimerización de actina y funciones relacionadas con el citoesqueleto, dando indicios de un posible mecanismo involucrado. Finalmente, y en línea con estos resultados, evidenciamos que Kp, una bacteria típicamente extracelular, logra persistir dentro de los PMN humanos hasta 5 horas, evadiendo su muerte intracelular.

Teniendo en cuenta los hallazgos descritos en los **capítulos 1 y 2**, podemos concluir que Kp es capaz de evadir la respuesta microbida de los PMN. En resumen, frente al encuentro con los PMN, Kp inhibe la migración de elastasa al núcleo y así la consecuente formación de NETs, aún en presencia de ROS. Además, impide la degranulación de los gránulos azurófilos. Esto se condice con la incapacidad de los PMN para contener a Kp extracelularmente. Por otro lado, intracelularmente Kp no co-localiza con la elastasa, posiblemente porque inhibe la polimerización de actina, resultando en una persistencia dentro de los PMN.

DISCUSION

Junto con el desarrollo del primer antibiótico, se describió también la existencia de bacterias con genes capaces de brindar resistencia a su acción. A partir de ese momento comenzó un recorrido en el cual distintos antimicrobianos fueron desarrollados a lo largo de los años. Sin embargo, frente a cada nuevo fármaco aprobado, diversos genes que confieren resistencia a los mismos fueron reportados ²⁰⁵. En el 2008 nació el acrónimo “ESKAPE”, como referencia a los seis patógenos causantes de la mayoría de las infecciones en los hospitales de EEUU y que efectivamente escapaban a los efectos de los antimicrobianos, siendo *Klebsiella pneumoniae* uno de los patógenos con mayor incidencia dentro del grupo ^{206,207}. Actualmente, es indudable el impacto de las bacterias multirresistentes en la salud pública: el número de muertes directamente atribuidas a infecciones con microorganismos multirresistentes ha aumentado a más de 1.2 millones en los últimos años. Los últimos reportes enfatizan que, de no lograr medidas efectivas para controlar esta problemática, el número de muertes anuales asociadas a bacterias multirresistentes aumentará a 10 millones para 2050 ^{4,5}. En este contexto, el desarrollo de nuevos antibióticos, junto con la combinación de los existentes, constituye la alternativa terapéutica actual. Sin embargo, la evolución bacteriana no cesa, y la aparición de resistencia a los antimicrobianos es inevitable, lo que demuestra que se necesita desarrollar terapias alternativas e innovadoras con urgencia ²⁰⁸. Así, se vuelve relevante la utilización de nuevos abordajes, como puede ser la intervención sobre células inmunes para favorecer su acción microbicida. Y para ello es imperioso conocer en detalle los mecanismos de evasión que presentan estos patógenos y su relación con el sistema inmune.

Klebsiella pneumoniae es uno de los patógenos más relevantes en el contexto de la multirresistencia. En particular, fue determinado que la emergencia y amplia distribución mundial de las bacterias productoras de carbapenemasas, lo cual confiere resistencia a una de las últimas opciones terapéuticas, ocurrió gracias a la exitosa diseminación del clon ST258 de *Klebsiella pneumoniae* ^{209,210}. Este clon llegó a ser causante de hasta el 68% de los brotes observados a nivel mundial, desde su primer aislamiento en el año

2001¹²⁰. En la Argentina, Kp (*Klebsiella pneumoniae* ST258 KPC⁺) es endémica y su primer aislamiento fue reportado en el año 2006^{151,211}.

Kp es principalmente un patógeno nosocomial, capaz de infectar pacientes inmunocomprometidos. El uso de materiales como catéteres o ventiladores, sumado a una mala higiene hospitalaria, el deficiente control epidemiológico y el mal uso de los antibióticos, son algunas de las causas que dan lugar a estas infecciones en el ambiente intra-hospitalario^{148,212}. Como consecuencia, hay un aumento en el tiempo de estadía hospitalaria, la ocurrencia de tratamientos fallidos y, finalmente, mayores costos de internación y altas tasas de mortalidad^{213–217}. La capacidad de adaptación que presenta *Klebsiella pneumoniae* es realmente destacable. A lo largo de los años, desde el desarrollo del primer antibiótico, la presencia de diversos mecanismos que le permiten enfrentar la presión de los fármacos antimicrobianos es una evidencia de su capacidad de adaptación. En este contexto, sumado a la problemática que representa la aparición de cepas multirresistentes, *Klebsiella pneumoniae* también ha adquirido herramientas para evadir la respuesta inmune^{155,218}. Por lo tanto, el estudio de la interacción entre el sistema inmune del huésped y las bacterias multirresistentes de relevancia clínica podría revelar puntos clave para la eliminación de las mismas y, eventualmente, conducir al desarrollo de terapias dirigidas al huésped, con el fin potenciar sus funciones bactericidas, y así resolver la infección²¹⁹.

Debemos destacar, a fin de comprender la magnitud del problema que representan estas bacterias multirresistentes y evasoras, que a pesar de poder agrupar cada aislado dentro de un grupo clonal o ST, también existe variabilidad dentro de cada ST de *Klebsiella pneumoniae*. De esta manera, podemos encontrar aislados de bacterias con fenotipo distinto, como ser mucoso y presentar una gruesa cápsula, lo cual se asocia a evasión de la fagocitosis, aunque también hay otros aislados con baja presencia de cápsula, que no evaden la fagocitosis. Además, cada aislado puede presentar distintos mecanismos de resistencia antimicrobiana. Aún así, todos estos aislados pueden terminar siendo agrupados dentro del mismo ST^{220,221}. Debemos, entonces, considerar que cada aislado tendrá ciertas características generales, por las

cuales pertenece a un ST, pero también tendrá sus particularidades, gracias a la gran variabilidad que puede originarse por el ambiente en el que se encuentre esa bacteria. En definitiva, por la rápida evolución y adaptación a ambientes que los rodean, es fundamental estudiar los aislados clínicos locales tanto a nivel epidemiológico como en su interacción con el sistema inmune: no será igual un aislado de *Klebsiella pneumoniae* del ST258 en Europa, con respecto a un aislado de Latinoamérica. En particular, fue descripto que *Klebsiella pneumoniae* es una especie altamente variable con respecto a la respuesta inmune que induce. En este sentido, se observó que dentro del ST258 existen cepas que generan respuestas inmunes distintas, en un modelo murino ¹⁶⁴.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la gran relevancia clínica que tiene Kp en Argentina y en el mundo, junto con la importancia de analizar y comprender el impacto de los aislamientos clínicos locales sobre la respuesta inmune, en este trabajo se profundizó en los mecanismos que permiten a Kp sobrevivir frente al encuentro con los PMN, célula fundamental de la respuesta inmune innata.

Previamente, nuestro grupo caracterizó la respuesta temprana del PMN frente a Kp, haciendo foco en el reconocimiento de la bacteria y la producción de ROS. En este trabajo de tesis, nos propusimos profundizar y extender los conocimientos de la respuesta de los PMN frente a Kp, con el fin de comprender qué estrategias podría estar empleando este patógeno para evadir la respuesta microbicida de los PMN.

En el **Esquema 7**, al final de esta sección, se presenta un modelo que incluye los resultados obtenidos así como algunos aspectos que serán abordados a lo largo de la discusión. Se muestran los estímulos positivos utilizados junto con algunas vías intracelulares involucradas. Además, se incluyen los hipotéticos blancos propuestos a través de los cuales Kp podría mediar los efectos observados sobre los PMN.

Un primer punto clave que nos permite pensar en la existencia de mecanismos de evasión de la respuesta inmune es la capacidad del microorganismo de sobrevivir frente al ataque del sistema inmune. En este sentido, nuestros resultados determinaron que los PMN humanos fueron

incapaces de contener a Kp en el tiempo, observándose un gran crecimiento extracelular de la bacteria (**Figura 1**). El recuento de UFC luego de 3 horas de incubación de PMN con Kp nos permitió confirmar que la bacteria es capaz de sobrevivir al encuentro con los PMN (**Figura 2**). La incapacidad de los PMN para contener a Kp, entonces, fue el puntapié para indagar un posible efecto evasor de la bacteria sobre los mecanismos microbicidas que posee el PMN.

Dentro de la respuesta del PMN, la formación de NETs, junto con la degranulación, constituyen los principales mecanismos microbicidas extracelulares. Considerando la co-evolución de la respuesta inmune con los patógenos, con la consecuente descripción de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune, no es una sorpresa que, desde la primera descripción de estas redes extracelulares, capaces tanto de contener como eliminar microorganismos, hayan surgido trabajos que describen diversas estrategias de evasión que impiden la liberación de las NETs, o bien las degradan ⁸³. Estos antecedentes, junto con la gran proliferación extracelular de Kp observada en presencia de los PMN, nos llevaron a focalizarnos en el estudio de la formación de NETs en presencia de Kp. No sólo encontramos que Kp es incapaz de inducir la formación de NETs en PMN humanos, sino que también fue capaz de inhibir la liberación de NETs inducida por estímulos positivos de distinta naturaleza (**Figuras 3, 6, 7 y 8**). La utilización de distintos tipos de estímulos positivos, los cuales inducen la formación de NETs a través de distintas vías, permite hipotetizar sobre posibles vías intracelulares involucradas. Dado que Kp inhibió la liberación de NETs con todos los estímulos utilizados, una primera explicación sencilla es que la bacteria tenga como blanco algún componente intracelular que sea común a las distintas vías de inducción, en lugar de suponer un mecanismo en particular para cada vía.

Todavía queda mucho por dilucidar con respecto a los componentes y vías involucradas en la formación de NETs ⁵². No obstante, existe acuerdo en algunos pasos o acontecimientos claves, así como componentes y vías involucradas, según el estímulo inductor de las NETs. En los años posteriores a la primera caracterización de la formación de NETs, fue reportada la necesidad de la producción de ROS en la formación de NETs ⁶¹, dando lugar a lo que

definimos como NETs NOX-dependientes. En este sentido, nuestro grupo ha reportado previamente que Kp es una pobre inductora de la producción de ROS y, más aún, es capaz de inhibir la producción de ROS gracias a un componente de su pared ⁹. A pesar de no brindar una explicación al impacto de Kp sobre la formación de NETs independientes de la producción de ROS (denominadas NOX-independientes), es lógico pensar que Kp podría estar afectando la formación de NETs NOX-dependientes a partir de la falta de producción de ROS. Sin embargo, hemos demostrado que Kp sigue siendo capaz de inhibir la formación de NETs, aunque haya producción de ROS, como observamos en presencia de PMA, Eco, plaquetas y anticuerpos naturales (**Figuras 11, 12, 15, 16 y 18**), lo cual evidencia que el impacto de Kp sobre la producción de ROS y la formación de NETs son eventos independientes. En este sentido, es interesante la observación de que Kp debe presentar más de una estrategia de evasión de la respuesta del PMN. Por un lado, mediante un componente de pared, afecta la producción de ROS, lo cual indefectiblemente tendrá otras consecuencias en la respuesta del PMN, como puede ser la falta de inducción de NETs NOX-dependientes. Sin embargo, evidenciamos que existe otra estrategia capaz de inhibir activamente la formación de NETs inducidas por diversos estímulos. Además, esta estrategia de evasión también tendrá su impacto en otras funciones del PMN, como son las funciones relacionadas a los gránulos azurófilos, que se discutirán más adelante. Recordando, entonces, que las NETs inducidas por ionomicina y algunos otros microorganismos no requieren de la enzima NOX y su consecuente producción de ROS ^{60,61,222}, la inhibición de las NETs aún en presencia de ROS refuerza la hipótesis de que Kp debe estar impactando sobre algún componente común a las distintas vías de inducción de la formación de NETs.

Años después, luego de conocerse el rol de la producción de ROS, fue reportada la migración de elastasa al núcleo como otro evento crucial en la formación de NETs suicidas NOX dependientes, inducidas por PMA ⁶³. También se ha descrito la presencia de elastasa en el núcleo durante la formación de NETs que no requieren de la NOX, es decir NOX-independientes ⁷⁴. El mecanismo propuesto por Metzler *et al* sugiere que la producción de ROS induce la migración de elastasa desde los gránulos azurófilos hacia el núcleo, ayudado

por la actina, donde media la descondensación de la cromatina. En este sentido, nos propusimos estudiar el impacto de Kp sobre la migración de elastasa al núcleo inducida por PMA o Eco. Sorprendentemente, descubrimos que Kp logra inhibir la migración de elastasa al núcleo inducida tanto por PMA como Eco, a pesar de los altos niveles de ROS encontrados. Al impedir la migración de elastasa al núcleo, no se observa la descondensación de la cromatina (**Figuras 19 y 20**) y por lo tanto no hay liberación de NETs. Este resultado nos sugiere que el impacto de Kp sobre la formación de NETs debería estar ocurriendo sobre algún componente o vía involucrada posterior a la producción de ROS, pero anterior a la llegada de la elastasa al núcleo. Esta hipótesis es acompañada por las conclusiones presentadas en el trabajo de Neubert *et al*, donde se estudió el estado de la cromatina y parámetros biofísicos durante la formación de NETs. Allí reportan que la llegada de la elastasa al núcleo es un punto de quiebre, dado que la fuerza de la descondensación de la cromatina hace irreversible la ruptura de la membrana nuclear y plasmática, con la consecuente liberación de NETs ⁶⁴. Por lo tanto, proponen que toda modulación de la formación de NETs debe ocurrir previo a este acontecimiento, lo cual va en línea con los resultados obtenidos en este trabajo.

Durante la activación del sistema inmune, los distintos componentes de la inmunidad innata y adaptativa, tanto humorales como celulares, interactúan entre sí moldeando el curso de la respuesta inmune ^{1,10}. Entendiendo las limitaciones que puede tener el estudio de células inmunes aisladas *in vitro*, creemos que este abordaje experimental es útil para comprender mecanismos básicos. Aún así, con el objetivo de aproximarnos hacia un contexto más parecido a un escenario “real” de encuentro entre Kp y los PMN, también incorporamos en nuestro sistema otros componentes relevantes de la inmunidad.

Es conocido el rol de los anticuerpos, capaces de opsonizar a los patógenos y potenciar la respuesta inmune. Además, hace algunos años ha crecido el interés en desarrollar vacunas contra las infecciones mediadas por los patógenos multirresistentes ²²³. En este sentido, el estudio de la respuesta inmune en presencia de anticuerpos específicos contra la bacteria nos permite

evaluar el impacto que tendría la vacunación en la respuesta inmune. Por otro lado, es necesario recordar que, en condiciones homeostáticas, existe también producción de anticuerpos por parte de linfocitos B1 y marginales del bazo, llamados anticuerpos naturales. Estos anticuerpos se producen espontáneamente, suelen reconocer estructuras polisacáridas repetitivas y no son específicos contra un patógeno en particular, sino que reconocen estructuras compartidas por patógenos ²²⁴. Pensando en un contexto fisiológico, el abordaje utilizado aquí, obteniendo anticuerpos naturales a partir de sueros de dadores sanos, nos podría situar en el escenario de una primo infección. Por esta razón, un primer paso importante fue la confirmación de que los anticuerpos naturales presentes en suero de dadores sanos (HS) son capaces de opsonizar a Kp (**Figura 9**). De manera interesante, en línea con el rol de los anticuerpos en la respuesta inmune, pudimos ver que la pre-incubación de Kp con el suero humano conteniendo los anticuerpos naturales (Kp-HS) potenció la fagocitosis, la producción de ROS y, consecuentemente, el *killing* intracelular de Kp (**Figuras 10, 11 y 13**). Sin embargo, la potenciación de estas respuestas del PMN no fue capaz de revertir la falta de NETs en presencia de Kp (**Figura 12**). Estos resultados acompañan los resultados previos del grupo donde vimos que Kp afectaba la producción de ROS gracias a un componente de pared ⁹, entendiendo que la presencia de anticuerpos naturales que reconocen componentes de pared de Kp revirtió la falta de ROS. A su vez, refuerza la hipótesis ya planteada de que Kp presenta, al menos, dos mecanismos de evasión independientes, dado que el incremento de ROS no es suficiente para revertir la falta de NETs. En el contexto de la producción de vacunas frente a este patógeno desafiante ²²⁵, estos resultados sugieren que la presencia de anticuerpos que opsonicen a Kp podrían ser capaces de potenciar la muerte intracelular de Kp. Sin embargo, dado que no observamos una modulación en la formación de NETs, podemos pensar que Kp aún podría ser capaz de diseminarse. En este sentido, estos resultados también podrían dar pie a una posible explicación de la falta de éxito de las vacunas desarrolladas hasta hoy. De todos modos, al pensar el efecto de las vacunas a partir de nuestros resultados, con el fin de llegar a conclusiones más certeras, es necesario remarcar que deberían incorporarse ensayos utilizando anticuerpos específicos

contra la bacteria, que probablemente serán de isotipo IgG y generarán un mayor nivel de opsonización.

Por otro lado, las plaquetas (PLT) constituyen otro componente importante de la respuesta inmune innata, encontrándose en circulación junto con los PMN. Además, se encuentra bien establecido que las PLT activadas son capaces de potenciar las respuestas microbidas del PMN, como la formación de NETs^{226,227}. Al analizar la interacción entre Kp y las PLT, observamos que las PLT unen a Kp y se activan, evidenciado por un aumento en p-selectina (**Figura 14**). En este sentido, la presencia de PLT fue capaz de aumentar la producción de ROS frente a Kp, confirmando que las PLT activadas modulan la respuesta del PMN. Sin embargo, la presencia de PLT no fue capaz de revertir la falta de NETs en presencia de Kp (**Figura 15**). De todos modos, las condiciones evaluadas tenían una limitación: en esas relaciones de PLT y Kp, no observamos un aumento de p-selectina. De manera interesante, incluso manteniendo la relación PLT-Kp en la cual se observó un aumento significativo en p-selectina, y representando una relación PMN-Kp un orden de magnitud mayor a la utilizada durante todo el trabajo (siempre es PMN:Kp 1:10, aquí es 1:250), las PLT fueron incapaces de revertir la falta de NETs en presencia de Kp (**Figura 16**). Este resultado refuerza que los efectos observados se deben a un mecanismo de inhibición activo por parte de la bacteria y no se explican por la falta de estímulo bacteriano. Más aún, tal como hemos observado en uno de nuestros trabajos publicados²⁰⁴, la inhibición de la formación de NETs por parte de Kp inclusive aumenta a mayores relaciones PMN:Kp. Como confirmación de los resultados obtenidos con anticuerpos naturales y PLT, observamos que incubando sangre entera junto con Kp había un aumento en la producción de ROS por parte de los PMN, pero no se observó liberación de NETs (**Figura 17**). Una vez más, estos resultados permiten restringir el mecanismo a través del cual Kp inhibe la formación de NETs a procesos o vías intracelulares posteriores a la producción de ROS. Efectivamente, el impacto de Kp sobre la respuesta del PMN no es un evento que sólo se observa de manera aislada, sino que aún en presencia de componentes inmunes relevantes sigue presente, evidenciando un efecto activo y dirigido sobre el PMN.

En general, los mecanismos empleados por patógenos que logran evadir las NETs involucran efectos directos o indirectos sobre la producción de ROS o bien la neutralización o degradación de las NETs liberadas ⁸³. Por resultados previos que fueron incluidos en el artículo publicado, junto con resultados de este trabajo de tesis, sabemos que la inhibición de la formación de NETs mediada por Kp no involucra a factores solubles liberados al medio extracelular ²⁰⁴. La reducción de la formación de NETs en presencia de Kp sumado al estado de la cromatina no descondensada en los PMN, refuerza la idea de que Kp tiene un impacto sobre algún punto del mecanismo de inducción de NETs, y no se trataría de mecanismos que neutralizan o degradan NETs liberadas.

No existen muchos reportes de patógenos modulando vías intracelulares del PMN con un efecto sobre la formación de NETs, pero algunos patógenos tienen como target a los gránulos azurófilos, los cuales contienen elastasa y MPO, actores claves en las NETs. En particular, se ha reportado que bacterias del género *Yersinia*, a través de un sistema de secreción tipo 3 (T3SS) y las proteínas efectoras YopE y YopH, afectan a la GTPasa Rac2 y la liberación de Ca^{2+} respectivamente, lo cual inhibe tanto la producción de ROS como la degranulación de los gránulos azurófilos ^{92,96,99,100}. Más aún, se han descrito cepas de *Klebsiella pneumoniae* ST258 no inductoras de la movilización de Ca^{2+} ¹⁶⁵. En línea con estos resultados, también se ha observado que PMN murinos *knock-out* para Rac2 son incapaces de movilizar los gránulos azurófilos y liberar NETs ^{39,68,69}. En nuestros experimentos, hemos observado que es necesaria la viabilidad de Kp, ya que Kp fijada es incapaz de inhibir la formación de NETs (**Figura 5**). A su vez, sabemos que Kp es fagocitada ⁹ y que sus componentes de pared no median la inhibición de las NETs, ya que un extracto de Kp enriquecido en componentes de pared indujo la formación de NETs ²⁰⁴. Podríamos pensar, entonces, que en nuestro sistema Kp se encuentre modulando algún componente intracelular una vez dentro del PMN, tal como lo hace *Yersinia*. Dados los antecedentes, podríamos plantear a Rac2 como un posible target ya que cumple una función clave tanto en la degranulación sólo de los gránulos azurófilos y en la formación de NETs ⁶⁸. Sin embargo, no podemos dejar de lado que Rac2 también cumple un papel relevante en la producción de ROS, siendo una de las sub-unidades de la NOX, y se desconoce el mecanismo

a través del cual modula las NETs. Por lo tanto, la falta de NETs en contextos donde se afecta Rac2 podría ser sólo por su rol en la producción de ROS. Aún queda mucho por dilucidar con respecto a los mecanismos moleculares involucrados en la formación de NETs, por lo que son necesarios trabajos que aborden esta temática y nos permitan comprender mejor este complejo proceso. De todos modos, el estudio del efecto de Kp sobre otras funciones del PMN que puedan estar relacionadas con la formación de NETs, como puede ser la movilización de los gránulos azurófilos, nos puede dar una visión general de la interacción de Kp con los PMN. De esta manera, podríamos proponer nuevas hipótesis sobre los mecanismos y posibles targets, así como también descartar hipótesis ya planteadas.

Siempre sospechamos que Kp tenía un impacto sobre la degranulación de los gránulos azurófilos, dado que en todos los experimentos realizados evaluando la formación de NETs encontramos disminuida la liberación de MPO. Confirmamos esta sospecha a partir del análisis de la expresión de CD63 en los PMN, un fiel marcador de la degranulación de los azurófilos (**Figura 24**), lo cual evidencia que Kp afecta particularmente la degranulación de gránulos azurófilos²⁰⁴. Otra función relevante de los gránulos azurófilos es la fusión con los fagosomas, donde la liberación de proteínas como la elastasa y péptidos antimicrobianos dan lugar a la muerte intracelular independiente del oxígeno, sumado al rol de la MPO que potencia el efecto de los radicales libres del oxígeno al originar especies aún más tóxicas. Sorprendentemente, Kp dentro de los PMN no co-localiza con la elastasa, contrariamente a lo observado con Eco (**Figura 23**). Además, la presencia de Kp fue capaz de disminuir la co-localización intracelular de la elastasa con Eco. Este resultado evidencia un impacto también sobre la fusión de los gránulos azurófilos con los fagosomas, demostrando que Kp es capaz de afectar las diversas funciones de los gránulos azurófilos. Este efecto de Kp sobre la dinámica de los gránulos azurófilos, además de la modulación de la formación de NETs, nos permite proponer otros targets (además de Rac2) que cumplan un rol en la fisiología de los gránulos azurófilos. En este sentido, con el conjunto de estos resultados, Rab27a, una GTPasa fuertemente vinculada a la degranulación de los gránulos azurófilos⁴¹ así como JFC1 o Munc13-4, dos proteínas adaptadoras específicas de Rab27⁴², podrían

ser los blancos de la acción de Kp. Sin embargo, aún se desconocen patógenos que tengan estas moléculas como target, así como su rol particular durante la formación de NETs. Además, todavía no está claro si Rab27a participa en la fusión de los gránulos azurófilos con los fagosomas, por lo que sería necesario tener más información para postularlo como un buen blanco de Kp.

A pesar de conocer el efecto de Kp sobre la producción de ROS en los PMN, observando también que luego de 1 hora Kp era capaz de evitar la muerte mediada por los PMN⁹, no sabíamos en aquel momento si Kp podía afectar otros fenómenos intracelulares del PMN. En este sentido, nuestros resultados demostrando la falta de llegada de la elastasa hacia los fagosomas que contienen a Kp acompaña los resultados previos: Kp no es eliminada a tiempos tempranos dado que afecta los dos mecanismos principales de muerte intracelular, la producción de ROS y la llegada al fagosoma de proteínas con función microbicida. Más allá de lo que ocurre intracelularmente con Kp, es llamativa la observación de que la presencia de Kp reduce la co-localización intracelular de la elastasa con Eco, una bacteria eficientemente eliminada (**Figura 23**). Además, la presencia de Kp también favoreció la supervivencia intracelular de Eco (**Figura 22**), probablemente gracias al efecto de Kp sobre la llegada de la elastasa a los fagosomas que contienen a Eco. Sumado a la inhibición de la formación de NETs en presencia de Kp, lo cual puede favorecer la diseminación bacteriana, estos resultados nos llevan a pensar en contextos preocupantes en la clínica. Cabe destacar que las infecciones polimicrobianas son comunes, así como los informes de infecciones por Kp junto con otros patógenos^{197,228,229}. De esta manera, los mecanismos de evasión de la respuesta inmune empleados por Kp podrían también favorecer el curso de infecciones mediadas por otros patógenos. En particular, durante la pandemia de COVID-19, se detectaron altas tasas de co-infección bacteriana en pacientes con SARS-CoV-2, siendo Kp una de las bacterias más comunes identificadas, lo cual además se asoció con un aumento en el riesgo de enfermedad severa^{230,231}. Este antecedente, más allá del rol que pueda cumplir Kp en las co-infecciones con virus, nos demuestra la prevalencia que tiene ésta bacteria multirresistente en los centros de salud a nivel mundial. En este sentido, es una clara evidencia de que la lucha contra los patógenos multirresistentes requiere de varios

abordajes. Sumado al estudio de los mecanismos de evasión, la interacción con el sistema inmune y la producción de fármacos o vacunas, la higiene de los hospitales junto con los estudios epidemiológicos que permiten entender su incidencia y persistencia en las distintas comunidades son también un aspecto fundamental.

El estudio de las distintas funciones mediadas por los componentes presentes en los gránulos azurófilos, más allá de la formación de NETs, podría ayudarnos a plantear nuevas hipótesis del mecanismo involucrado. Con la idea de poner a prueba una hipótesis simple, donde el impacto de Kp sobre las funciones del PMN se pueda explicar por la acción sobre un único componente, el citoesqueleto surgió como un buen candidato. En este sentido, el citoesqueleto gobierna los movimientos intracelulares, siendo evidente su rol en la movilización de los gránulos del PMN. Además, se ha demostrado la necesidad de un citoesqueleto activo para la formación de NETs ^{64,67}. Existen diversos reportes de patógenos capaces de afectar el citoesqueleto ^{82,83}, por lo que es lógico plantearlo como un posible target de Kp. En línea con esta hipótesis, nuestros resultados indican que Kp es capaz de inhibir la polimerización de actina en PMN humanos, inducida tanto por fMLP como por Eco (**Figuras 25 y 26**), sugiriendo un impacto de Kp en la actividad del citoesqueleto. Es importante volver a remarcar que en estos experimentos fue necesaria una pre-incubación de los PMN con Kp por 90 minutos. Debemos recordar que las respuestas tempranas frente a Kp, las cuales también están relacionadas con el citoesqueleto, como son la quimiotaxis, la degranulación de las vesículas secretorias, los gránulos secundarios y terciarios, junto con la fagocitosis, no se encuentran afectadas. Además, ningún componente de pared ni factor soluble median la inhibición de las NETs por parte de Kp ²⁰⁴, mientras que sí es necesaria su viabilidad. Por lo tanto, podemos pensar que el efecto inhibitorio de Kp comenzaría recién una vez fagocitada. De esta manera, la temporalidad del proceso podría explicar por qué Kp afecta únicamente a los gránulos azurófilos. Bajo esta lógica, a pesar de que el citoesqueleto sea relevante para todas las funciones nombradas, sólo se verán afectados los procesos del PMN que ocurren más tardíamente, luego de que Kp haya sido fagocitada. Esta idea se refuerza con los experimentos que demuestran que Kp sí inhibe algunas funciones relacionadas con el

citoesqueleto, pero sólo luego de la pre-incubación (**Figuras 28 y 29**). Acompañando esta hipótesis, es interesante remarcar que, así como para otros patógenos, se ha reportado que cepas de *Klebsiella pneumoniae* pertenecientes al ST258 poseen genes que codifican para un sistema de secreción tipo 6 (T6SS)^{232,233}. En este sentido, a través de un T6SS Kp podría inyectar factores mediadores de los efectos inhibitorios del citoesqueleto luego de transcurrido un tiempo de ser fagocitada, tiempo necesario para la producción y ensamble del sistema de secreción.

Para poner a prueba algunas hipótesis sería necesaria la utilización de herramientas que no pudieron ser abordadas durante el trabajo de tesis. Por un lado, la construcción de cepas de Kp mutantes para genes relevantes, como podrían ser del T6SS y putativas proteínas efectoras, así como genes relacionados con la cápsula, podrían dar pistas del mecanismo involucrado, al observar si hay reversión en la inhibición de NETs. Al mismo tiempo, pensando en posibles targets puntuales, podría evaluarse el rol de GTPasas del PMN al ver su estado de activación, unión a GTP o GDP, mediante columnas⁹⁶. Además, con las tecnologías actuales y su aplicación en las líneas de investigación, una transcriptómica de algunas condiciones evaluadas en el trabajo, como PMN en presencia de Kp, Eco, o sin estimular, donde se evalúe la expresión de distintos genes en los PMN, podría ser una guía en el posible mecanismo intracelular afectado. Hemos intentado el abordaje de estos experimentos, así como alternativas a ellos, pero tanto por razones económicas como metodológicas aún siguen pendientes, esperando a ser abordados próximamente.

En paralelo a la búsqueda de los mecanismos involucrados en la inhibición de la formación de NETs por parte de Kp, nos propusimos indagar qué consecuencias tendría en la supervivencia intracelular de Kp la pobre inducción de ROS junto con la ausencia de elastasa en los fagosomas. A pesar de ser una bacteria de vida extracelular, ya se ha reportado que otra cepa de *Klebsiella pneumoniae* es capaz de persistir dentro de macrófagos^{184,234}. Además, se encontró que aislamientos pertenecientes al ST258 pueden persistir dentro de PMN murinos^{165,174}. Y esto no es algo exclusivo de *Klebsiella pneumoniae*, ya que un fenómeno similar se ha reportado para otras bacterias de vida

extracelular, como *Staphylococcus aureus*^{235–237}. A partir de imágenes obtenidas por microscopía de transmisión electrónica (TEM) junto con la cuantificación de UFC intracelulares, pudimos determinar que Kp persiste dentro de los PMN humanos hasta por 5 horas (**Figuras 30, 31 y 32**). Este hallazgo no deja de ser sorprendente, ya que refuerza la idea de que tienen que existir mecanismos de evasión activos por parte de Kp: no cualquier patógeno logra persistir dentro del PMN. A su vez, abre nuevos interrogantes que nuestro grupo se encuentra evaluando. Por un lado, pensando en la dificultad para resolver la infección mediada por Kp, sería interesante indagar qué pasaría en los macrófagos que fagociten a PMN infectados con Kp, más allá de cuánto tiempo logre persistir Kp dentro de los PMN. En este fenómeno, denominado eferocitosis, se induce en los macrófagos un perfil anti-inflamatorio, asociado a reparación tisular y resolución de la infección. Sin embargo, en este caso, dicho perfil podría favorecer la persistencia de Kp, abriendo la posibilidad de un potencial reservorio para la bacteria, en un contexto anti-inflamatorio que ya se ha reportado en modelos murinos de infección pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*¹⁸⁹. En línea con esto, y volviendo a focalizar en los PMN, sería necesario estudiar la inducción de apoptosis en presencia de Kp. Este tipo de muerte está asociado a la eferocitosis de los PMN, en particular gracias al aumento en la expresión en membrana plasmática de moléculas denominadas “señales *eat-me*”. Ciertos patógenos pueden retrasar o acelerar la apoptosis en los PMN, y existen evidencias que contraponen las vías intracelulares involucradas en la muerte por la formación de NETs con respecto a la muerte por apoptosis²³⁸. Por lo tanto, podríamos postular que Kp favorecería la apoptosis de los PMN dando lugar a su eferocitosis por macrófagos residentes, induciendo así un microambiente anti-inflamatorio que permita la persistencia de Kp en el foco infeccioso. Por otro lado, a partir de las evidencias que proponen que los PMN son capaces de recircular, en un proceso denominado “migración reversa”²³⁹, sería interesante evaluar si éste fenómeno podría cumplir un rol relevante en la diseminación de Kp, más allá de la falta de NETs. En línea con esta idea, se ha reportado que los PMN pueden servir como “taxi” y favorecer la diseminación de *Acinetobacter baumannii*²⁴⁰.

Considerando el antecedente de *Klebsiella pneumoniae* persistiendo dentro de macrófagos, otra posible hipótesis a evaluar puede ser que Kp presente un tránsito intracelular no convencional. Esta posible estrategia debería estar más relacionada a algún componente de la pared, al igual que el impacto sobre la producción de ROS, entendiendo que la fagocitosis es vía receptores de membrana al reconocer estructuras de la pared bacteriana. Uno de nuestros resultados que podría acompañar esta hipótesis es el aumento de la muerte intracelular observado en presencia de anticuerpos naturales (**Figura 13**), lo cual podría sugerirnos que Kp puede ser eliminada correctamente si es fagocitada vía un receptor de la fracción constante (Fc) del anticuerpo y se mantuviera un tránsito intracelular convencional. De ser fagocitada por otra vía, podría derivar a un fagosoma no convencional, que no co-localiza con elastasa. Dentro de los macrófagos, observaron que *Klebsiella pneumoniae* se localizaba en compartimentos particulares, modulando la vía PI3K – Akt – Rab14 para controlar la maduración del fagosoma¹⁸⁴. Una desventaja del estudio del tránsito intracelular en PMN es que pareciera ser distinto a la maduración del fagosoma convencional, aunque comparta algunas características generales, por lo que se conocen menos detalles del fenómeno, lo que dificulta su abordaje. Hemos intentado estudiar cómo es el tránsito de Kp dentro de los PMN, utilizando un marcador típico de endosomas tempranos, como es EEA-1. Sin embargo, por microscopía confocal, no hemos podido observar expresión de dicho marcador en los PMN y sólo pudimos caracterizar la presencia de elastasa en los fagosomas. Para profundizar en esta hipótesis podrían utilizarse sondas capaces de medir el pH dentro de los fagosomas, lo cual es otro indicio de maduración, así como también caracterizar los fagosomas que contienen a Kp utilizando otros marcadores reportados en las distintas etapas del proceso de maduración de los fagosomas.

Finalmente, en este trabajo de tesis hemos podido estudiar la respuesta del PMN frente a otros aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*. Como ya fue dicho, una característica de las bacterias, y en particular de *Klebsiella pneumoniae*, es su rápida adaptación a nuevos ambientes. Existe vasta evidencia que refleja esta diversidad, tanto a nivel de resistencias a fármacos, como estructura de la bacteria y la respuesta inmune que inducen. En estas

diferencias es que crece la relevancia de estudiar aislados clínicos locales que permitan entender lo que ocurre en los centros de salud de la región. En otras palabras, más allá de lo que ocurra con un aislado de *Klebsiella pneumoniae* del ST258 en otro lugar del mundo, debemos indagar si en Argentina las cepas circulantes se comportan de la misma manera. Por esta razón, gracias a la colaboración establecida con el Laboratorio de Antimicrobianos del Instituto Malbran, pudimos utilizar distintos aislados de *Klebsiella pneumoniae*, pertenecientes a distintos ST o bien con distintas resistencias antimicrobianas (ver **Tabla 1**), pero todos provenientes de hospitales de Argentina. De manera interesante, encontramos que la inhibición de las NETs inducidas por PMA, así como la inhibición de la polimerización de actina, se observó en presencia de cepas del ST258, tanto positivas como negativas para KPC, y con un clon ST307, el cual ha tomado relevancia en los últimos años ¹⁵². Estos resultados nos sugieren que el mecanismo de evasión encontrado no es específico del aislado clínico utilizado para este trabajo de tesis, tampoco depende de la presencia de KPC y podría estar extendido hacia otras cepas de *Klebsiella pneumoniae* que circulan en las unidades de cuidados intensivos, más allá del ST258.

En resumen, en este trabajo encontramos una estrategia empleada por Kp que le permite evitar la eliminación mediada por PMN, donde se afecta un proceso (la movilización de gránulos azurofilos), pero se observan dos consecuencias. Esta estrategia dual interfiere con la movilización de elastasa hacia los fagosomas que contienen a Kp, permitiendo la persistencia dentro de los PMN, y también afecta la migración de elastasa al núcleo, impidiendo la formación de NETs, lo que representa una clara ventaja para la diseminación extracelular.

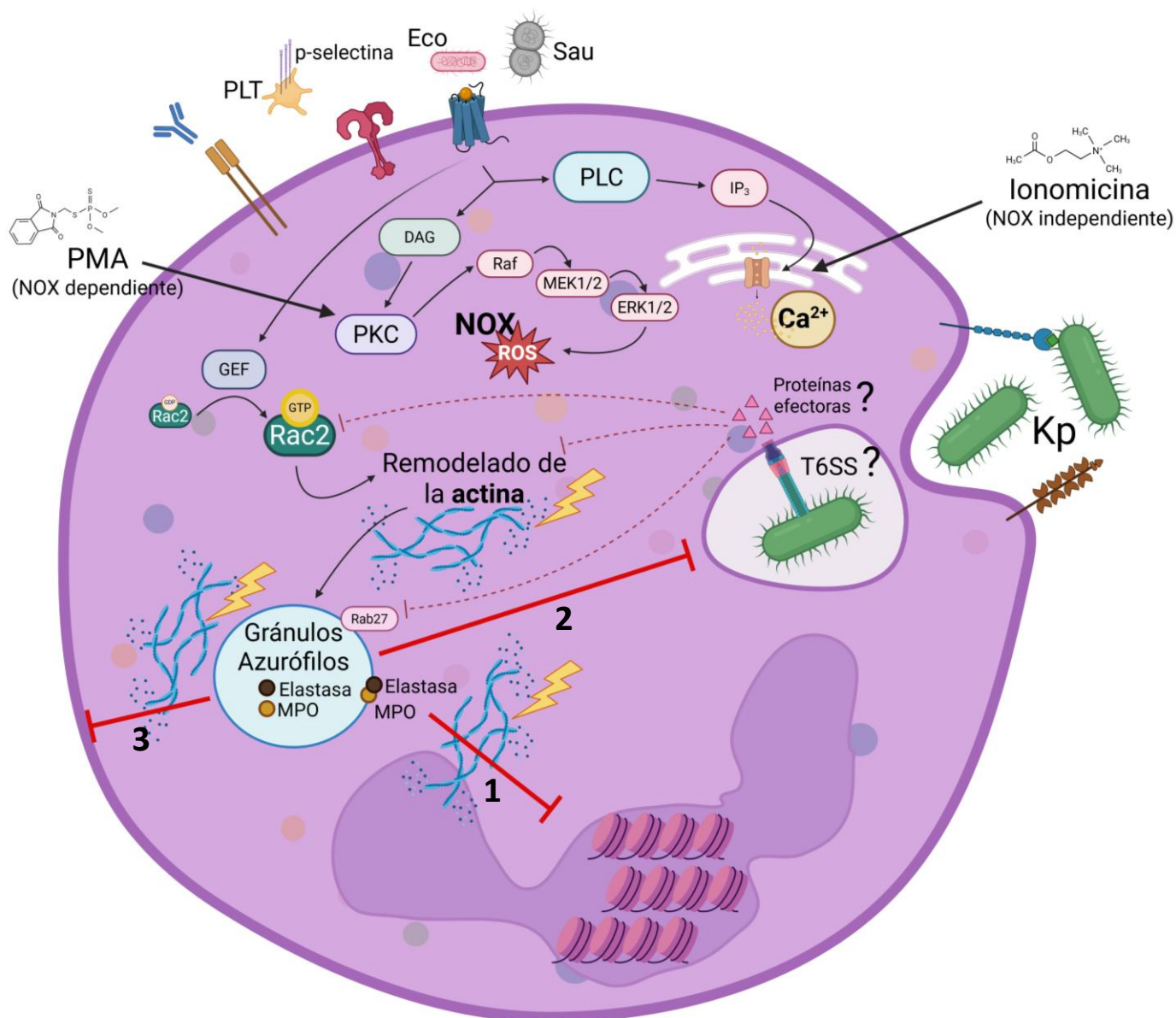
La complejidad de los mecanismos de evasión empleados por Kp hace pensar que deben ser necesarios múltiples enfoques, más allá de las pocas combinaciones de antimicrobianos aún disponible, la aparición de nuevas drogas antimicrobianas y el desarrollo de vacunas, para resolver las infecciones mediadas por este patógeno evasor. En este sentido, los resultados presentados en este trabajo podrían dar pie a la completa descripción del mecanismo de evasión encontrado, entendiendo que desbloquearlo podría servir como una

estrategia terapéutica alternativa y/o complementaria al uso de antimicrobianos. Asimismo, también es importante destacar que el descubrimiento del factor específico de Kp involucrado en la modulación de la respuesta del PMN podría ser utilizado como herramienta en patologías donde la formación de NETs juega un rol perjudicial.

Modelo propuesto de los mecanismos de evasión de Kp sobre el PMN

A partir del conjunto de los resultados presentados en este trabajo de tesis y considerando los datos bibliográficos volcados en la discusión, en el **Esquema 7** se muestra un resumen incluyendo los posibles mecanismos a través de los cuales Kp logra evadir su eliminación por parte de los PMN. Luego de la interacción de los PMN con Kp, hemos demostrado que la bacteria es fagocitada y es capaz de afectar procesos esenciales para su efectiva eliminación: 1- la migración de elastasa al núcleo, 2- la fusión de los gránulos azurófilos con el fagosoma y 3- la movilización de los gránulos azurófilos a la membrana plasmática. En estos procesos participan la elastasa y MPO, contenidas en los gránulos azurófilos, y dependen del correcto funcionamiento del citoesqueleto de actina.

Por lo tanto, se propone que Kp, posiblemente a través de proteínas efectoras liberadas por el ensamblado de un T6SS, interfiere con la polimerización de actina. Estas hipotéticas proteínas efectoras podrían tener como blanco celular tanto a Rac2, a proteínas del citoesqueleto o bien a Rab27, afectando así los procesos donde los gránulos azurófilos están involucrados. Como consecuencia de estos fenómenos, Kp no induce la formación de NETs ni la degranulación de los gránulos azurófilos, evadiendo las respuestas microbicidas extracelulares del PMN y, a su vez, es capaz de persistir dentro de los PMN, evadiendo también los mecanismos de muerte intracelular.



Esquema 7. Modelo propuesto de la evasión de Kp sobre el PMN. Se representa la fagocitosis de la bacteria y la propuesta del ensamblaje del T6SS con sus proteínas efectoras. Los rayos amarillos representan el impacto sobre la polimerización de actina, las líneas rojas la inhibición de los tres procesos enumerados en la descripción del esquema y las líneas punteadas los hipotéticos blancos celulares. Se incluyen los estímulos positivos utilizados y algunas de las vías intracelulares potencialmente involucradas. Creado en <https://BioRender.com>

Federico Birnberg Weiss
Alumno

Gabriela Fernandez
Directora

BIBLIOGRAFÍA

1. Medzhitov R, Janeway C. Innate Immunity. *N Engl J Med*. 2000;343:338-344. doi:10.1056/NEJM200008033430506
2. Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The Neutrophil. *Immunity*. 2021;54:1377-1391. doi:10.1016/j.immuni.2021.06.006
3. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* (80-). 2004;303(5663):1532-1535. doi:10.1126/science.1092385
4. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318-327. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
5. Sati H, Carrara E, Savoldi A, et al. The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis*. Published online April 2025. doi:10.1016/S1473-3099(25)00118-5
6. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18:344-359. doi:10.1038/s41579-019-0315-1
7. Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(10):1520-1524. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03600.x
8. Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF, Budnick JA, et al. Finding order in the chaos: Outstanding questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. *Infect Immun*. 2021;89(4). doi:10.1128/IAI.00693-20
9. Castillo LA, Birnberg-Weiss F, Rodriguez-Rodriguez N, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 Negatively Regulates the Oxidative Burst in Human Neutrophils. *Front Immunol*. 2019;10(APR):929. doi:10.3389/fimmu.2019.00929
10. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*. 1998;10:351-353. doi:10.1006/smim.1998.0136
11. Danilova N. The evolution of immune mechanisms. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol*. 2006;306:496-520. doi:10.1002/jez.b.21102
12. Edwards SW. *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*. Cambridge University Press; 1994.
13. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 2014;15(7):602-611. doi:10.1038/ni.2921
14. Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood*. 2002;100:854-861. doi:10.1182/blood.V100.3.854

15. Lok LSC, Dennison TW, Mahbubani KM, Saeb-Parsy K, Chilvers ER, Clatworthy MR. Phenotypically distinct neutrophils patrol uninfected human and mouse lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116:19083-19089. doi:10.1073/pnas.1905054116
16. Vono M, Lin A, Norrby-Teglund A, Koup RA, Liang F, Loré K. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4+ T cells in vitro and ex vivo. *Blood*. 2017;129:1991-2001. doi:10.1182/blood-2016-10-744441
17. Rodriguez-Rodrigues N, Castillo LA, Landoni VI, et al. Prokaryotic RNA associated to bacterial viability induces Polymorphonuclear neutrophil activation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(JUL):306. doi:10.3389/fcimb.2017.00306
18. Aida Y, Pabst MJ. Priming of neutrophils by lipopolysaccharide for enhanced release of superoxide. Requirement for plasma but not for tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*. 1990;145:3017-3025. doi:10.4049/jimmunol.145.9.3017
19. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007;100:158-173. doi:10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a
20. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:803-815. doi:10.1038/nri2171
21. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-670. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011
22. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect*. 2003;5:1299-1306. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.014
23. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):e1004651. doi:10.1371/journal.ppat.1004651
24. Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol*. 2013;93:185-198. doi:10.1189/jlb.0712349
25. DeLeo FR, Allen LAH, Apicella M, Nauseef WM. NADPH Oxidase Activation and Assembly During Phagocytosis. *J Immunol*. 1999;163:6732-6740. doi:10.4049/jimmunol.163.12.6732
26. Nunes P, Demarex N, Dinauer MC. Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis. *Traffic*. 2013;14:1118-1131. doi:10.1111/tra.12115
27. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(2):153-164.
28. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):181-189. doi:10.1038/nri1312

29. Roos D, Van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003;5:1307-1315. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.009
30. Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2006;2(3):98-108. doi:10.2310/7480.2006.00012
31. Yin C, Heit B. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. *Cell Tissue Res.* 2018;371(3):455-471. doi:10.1007/s00441-017-2731-8
32. Cowland JB, Borregaard N. Isolation of neutrophil precursors from bone marrow for biochemical and transcriptional analysis. *J Immunol Methods.* 1999;232:191-200. doi:10.1016/S0022-1759(99)00176-3
33. Garwicz D, Lennartsson A, Jacobsen SEW, Gullberg U, Lindmark A. Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model. *Haematologica.* 2005;90:38-44.
34. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5:1317-1327. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.008
35. Ramadass M, Catz SD. Molecular mechanisms regulating secretory organelles and endosomes in neutrophils and their implications for inflammation. *Immunol Rev.* 2016;273:249-265. doi:10.1111/imr.12452
36. Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, et al. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol.* 1993;51:187-198. doi:10.1111/j.1600-0609.1993.tb00629.x
37. Naegelen I, Beaume N, Plançon S, Schenten V, Tschirhart EJ, Brécard S. Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting. *J Immunol Res.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/817038
38. Johnson JL, Brzezinska AA, Tolmachova T, et al. Rab27a and Rab27b regulate neutrophil azurophilic granule exocytosis and NADPH oxidase activity by independent mechanisms. *Traffic.* 2010;11:533-547. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.01029.x
39. Abdel-Latif D, Steward M, Macdonald DL, Francis GA, Dinanier MC, Lacy P. Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood.* 2004;104(3):832-839. doi:10.1182/blood-2003-07-26242003-07-2624 [pii]
40. Abdel-Latif D, Steward M, Lacy P. Neutrophil primary granule release and maximal superoxide generation depend on Rac2 in a common signalling pathway. In: *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* Vol 83. ; 2005:69-75. doi:10.1139/y04-123
41. Munafó DB, Johnson JL, Ellis BA, Rutschmann S, Beutler B, Catz SD. Rab27a is a key component of the secretory machinery of azurophilic granules in granulocytes. *Biochem J.* 2007;402(2):229-239. doi:10.1042/BJ20060950

42. Brzezinska AA, Johnson JL, Munafo DB, et al. The Rab27a effectors JFC1/Slp1 and munc13-4 regulate exocytosis of neutrophil granules. *Traffic*. 2008;9:2151-2164. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00838.x
43. Pham CTN. Neutrophil serine proteases: Specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:541-550. doi:10.1038/nri1841
44. Belaaouaj A, McCarthy R, Baumann M, et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med*. 1998;4:615-618. doi:10.1038/nm0598-615
45. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*. 2002;416:291-297. doi:10.1038/416291a
46. Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev*. 2016;273:11-28. doi:10.1111/imr.12440
47. Catz SD, McLeish KR. Therapeutic targeting of neutrophil exocytosis. *J Leukoc Biol*. 2020;107(3):393-408. doi:10.1002/JLB.3RI0120-645R
48. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231-241. doi:10.1083/jcb.200606027
49. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(8):577-582. doi:10.1038/nrmicro1710
50. Kaplan MJ. Casting a Wide NET. *J Immunol*. 2022;209:843-844. doi:10.4049/jimmunol.2200173
51. Damascena HL, Silveira WAA, Castro MS, Fontes W. Neutrophil Activated by the Famous and Potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). *Cells*. 2022;11(18). doi:10.3390/cells11182889
52. Boeltz S, Amini P, Anders HJ, et al. To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2019;26(3):395-408. doi:10.1038/S41418-018-0261-X
53. Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*. 2019;133(20):2178-2185. doi:10.1182/BLOOD-2018-11-844530
54. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(11):2990-3003. doi:10.1002/art.39247
55. Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med*. 2016;22(2):146-153. doi:10.1038/nm.4027
56. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013;5.

doi:10.1126/scitranslmed.3005580

57. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):134-147. doi:10.1038/nri.2017.105
58. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-691. doi:10.1083/jcb.201006052
59. Hidalgo A, Libby P, Soehnlein O, Aramburu IV, Papayannopoulos V, Silvestre-Roig C. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. *Cardiovasc Res.* 2022;118:2737-2753. doi:10.1093/cvr/cvab329
60. Kenny EF, Herzig A, Kruger R, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife.* 2017;6. doi:10.7554/eLife.24437
61. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol.* 2012;92(4):841-849. doi:10.1189/JLB.1211601
62. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol.* 2011;7(2):75-77. doi:10.1038/nchembio.496
63. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 2014;8(3):883-896. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.044
64. Neubert E, Meyer D, Rocca F, et al. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat Commun.* 2018;9(1):3767. doi:10.1038/s41467-018-06263-5
65. Sollberger G, Choidas A, Burn GL, et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol.* 2018;3(26). doi:10.1126/sciimmunol.aar6689
66. Thiama HR, Wong SL, Qiu R, et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117:7326-7337. doi:10.1073/pnas.1909546117
67. Sprenkeler EGG, Tool ATJ, Henriët SSV, van Bruggen R, Kuijpers TW. Formation of neutrophil extracellular traps requires actin cytoskeleton rearrangements. *Blood.* 2022;139(21):3166-3180. doi:10.1182/BLOOD.2021013565
68. Gavillet M, Martinod K, Renella R, Wagner DD, Williams DA. A key role for Rac and Pak signaling in neutrophil extracellular traps (NETs) formation defines a new potential therapeutic target. *Am J Hematol.* 2018;93(2):269-276. doi:10.1002/ajh.24970

69. Lim MB, Kuiper JW, Katchky A, Goldberg H, Glogauer M. Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *J Leukoc Biol.* 2011;90(4):771-776. doi:10.1189/jlb.1010549
70. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010;207(9):1853-1862. doi:10.1084/jem.20100239
71. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* (80-). 2004;306:279-283. doi:10.1126/science.1101400
72. Arita K, Hashimoto H, Shimizu T, Nakashima K, Yamada M, Sato M. Structural basis for Ca²⁺-induced activation of human PAD4. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:777-783. doi:10.1038/nsmb799
73. Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(9):2817-2822. doi:10.1073/pnas.1414055112
74. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med.* 2017;23(3):279-287. doi:10.1038/nm.4294
75. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13(4):463-469. doi:10.1038/nm1565
76. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784-2794. doi:10.1182/blood-2013-04-457671
77. Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010;185(12):7413-7425. doi:10.4049/JIMMUNOL.1000675
78. Yipp BG, Petri B, Salina D, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* 2012;18(9):1386-1393. doi:10.1038/nm.2847
79. Tan C, Aziz M, Wang P. The vitals of NETs. *J Leukoc Biol.* 2021;110:797-808. doi:10.1002/JLB.3RU0620-375R
80. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438-1444. doi:10.1038/cdd.2009.96
81. Blake DR, Allen R. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1003604/>. Published online 1988.
82. Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A. How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol.* 2006;8(11):1687-1696. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00792.x

83. Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo FR. Neutrophils and Bacterial Immune Evasion. *J Innate Immun.* 2018;10(5-6):432-441. doi:10.1159/000487756
84. Finkel-Jimenez B, Wüthrich M, Klein BS. BAD1, an Essential Virulence Factor of *Blastomyces dermatitidis*, Suppresses Host TNF- α Production Through TGF- β -Dependent and -Independent Mechanisms. *J Immunol.* 2002;168:5746-5755. doi:10.4049/jimmunol.168.11.5746
85. Sierig G, Cywes C, Wessels MR, Ashbaugh CD. Cytotoxic effects of streptolysin O and streptolysin S enhance the virulence of poorly encapsulated group A streptococci. *Infect Immun.* 2003;71:446-455. doi:10.1128/IAI.71.1.446-455.2003
86. Miyoshi-Akiyama T, Takamatsu D, Koyanagi M, Zhao J, Imanishi K, Uchiyama T. Cytocidal effect of *Streptococcus pyogenes* on mouse neutrophils in vivo and the critical role of streptolysin S. *J Infect Dis.* 2005;192:107-116. doi:10.1086/430617
87. Stevens DL, Mitten J, Henry C. Effects of α and θ Toxins from *Clostridium Perfringens* on Human Polymorphonuclear Leukocytes. *J Infect Dis.* 1987;156:324-333. doi:10.1093/infdis/156.2.324
88. DuMont AL, Yoong P, Day CJ, et al. *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:10794-10799. doi:10.1073/pnas.1305121110
89. Prince LR, Bianchi SM, Vaughan KM, et al. Subversion of a Lysosomal Pathway Regulating Neutrophil Apoptosis by a Major Bacterial Toxin, Pyocyanin. *J Immunol.* 2008;180:3502-3511. doi:10.4049/jimmunol.180.5.3502
90. Cress BF, Englaender JA, He W, Kasper D, Linhardt RJ, Koffas MAG. Masquerading microbial pathogens: Capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38:660-697. doi:10.1111/1574-6976.12056
91. Hovingh ES, van den Broek B, Jongerius I. Hijacking Complement Regulatory Proteins for Bacterial Immune Evasion. *Front Microbiol.* 2016;7:2004. doi:10.3389/fmicb.2016.02004
92. Rolán HG, Durand EA, Meccas J. Identifying yersinia yopH-targeted signal transduction pathways that impair neutrophil responses during in vivo murine infection. *Cell Host Microbe.* 2013;14:306-317. doi:10.1016/j.chom.2013.08.013
93. Carlyon JA, Latif DA, Pypaert M, Lacy P, Fikrig E. *Anaplasma phagocytophilum* utilizes multiple host evasion mechanisms to thwart NADPH oxidase-mediated killing during neutrophil infection. *Infect Immun.* 2004;72:4772-4783. doi:10.1128/IAI.72.8.4772-4783.2004
94. McCaffrey RL, Schwartz JT, Lindemann SR, et al. Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*. *J Leukoc Biol.* 2010;88:791-805. doi:10.1189/jlb.1209811

95. Smirnov A, Daily KP, Criss AK. Assembly of NADPH oxidase in human neutrophils is modulated by the opacity-associated protein expression state of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*. 2014;82:1036-1044. doi:10.1128/IAI.00881-13
96. Songsungthong W, Higgins MC, Rolán HG, Murphy JL, Mecsas J. ROS-inhibitory activity of YopE is required for full virulence of *Yersinia* in mice. *Cell Microbiol*. 2010;12:988-1001. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01448.x
97. Vareechon C, Zmina SE, Karmakar M, Pearlman E, Rietsch A. *Pseudomonas aeruginosa* Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils. *Cell Host Microbe*. 2017;21(5):611-618.e5. doi:10.1016/j.chom.2017.04.001
98. Stapels DAC, Geisbrecht B V., Rooijackers SHM. Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. *Curr Opin Microbiol*. 2015;23:42-48. doi:10.1016/j.mib.2014.11.002
99. Eichelberger KR, Jones GS, Goldman WE. Inhibition of Neutrophil Primary Granule Release during *Yersinia pestis* Pulmonary Infection. *MBio*. 2019;10(6). doi:10.1128/MBIO.02759-19
100. Taheri N, Fahlgren A, Fällman M. *Yersinia pseudotuberculosis* blocks neutrophil degranulation. *Infect Immun*. 2016;84:3369-3378. doi:10.1128/IAI.00760-16
101. Baz AA, Hao H, Lan S, et al. Neutrophil extracellular traps in bacterial infections and evasion strategies. *Front Immunol*. 2024;15. doi:10.3389/FIMMU.2024.1357967
102. Janssen L, Muller HS, Martins V de P. Unweaving the NET: Microbial strategies for neutrophil extracellular trap evasion. *Microb Pathog*. 2022;171. doi:10.1016/j.micpath.2022.105728
103. Ou Q, Fang J qi, Zhang Z sheng, et al. TcpC inhibits neutrophil extracellular trap formation by enhancing ubiquitination mediated degradation of peptidylarginine deiminase 4. *Nat Commun*. 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-23881-8
104. Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, et al. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun*. 2010;2(6):576-586. doi:10.1159/000319909
105. Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science (80-)*. 2013;342(6160):863-866. doi:10.1126/science.1242255
106. Wilton M, Halverson TWR, Charron-Mazenod L, Parkins MD, Lewenza S. Secreted Phosphatase and Deoxyribonuclease Are Required by *Pseudomonas aeruginosa* To Defend against Neutrophil Extracellular Traps. *Infect Immun*. 2018;86(9). doi:10.1128/IAI.00403-18
107. Moon AF, Gaudu P, Pedersen LC. Structural characterization of the virulence factor nuclease A from *Streptococcus agalactiae*. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2014;70(11):2937-2949.

doi:10.1107/S1399004714019725

108. de Buhr N, Neumann A, Jerjomiceva N, von Kockritz-Blickwede M, Baums CG. Streptococcus suis DNase SsnA contributes to degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) and evasion of NET-mediated antimicrobial activity. *Microbiology*. 2014;160(Pt 2):385-395. doi:10.1099/mic.0.072199-0
109. Möllerherm H, Neumann A, Schilcher K, et al. Yersinia enterocolitica-mediated degradation of neutrophil extracellular traps (NETs). *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362(23):fnv192. doi:10.1093/femsle/fnv192
110. Doke M, Fukamachi H, Morisaki H, Arimoto T, Kataoka H, Kuwata H. Nucleases from Prevotella intermedia can degrade neutrophil extracellular traps. *Mol Oral Microbiol*. 2017;32(4):288-300. doi:10.1111/omi.12171
111. Moon AF, Krahn JM, Lu X, Cuneo MJ, Pedersen LC. Structural characterization of the virulence factor Sda1 nuclease from Streptococcus pyogenes. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:3946-3957. doi:10.1093/nar/gkw143
112. Bryzek D, Ciaston I, Dobosz E, et al. Triggering NETosis via protease-activated receptor (PAR)-2 signaling as a mechanism of hijacking neutrophils function for pathogen benefits. *PLoS Pathog*. 2019;15. doi:10.1371/journal.ppat.1007773
113. Xie F, Zan Y, Zhang Y, et al. The cysteine protease ApdS from Streptococcus suis promotes evasion of innate immune defenses by cleaving the antimicrobial peptide cathelicidin LL-37. *J Biol Chem*. 2019;294(47):17962-17977. doi:10.1074/jbc.RA119.009441
114. CHAPMAN OD. The genus Klebsiella. *J Bacteriol*. 1946;51:637. doi:10.1007/0-387-30746-x_8
115. Hoffman N, Preston F. Friedlander's pneumonia: Report of 11 Cases and Appraisal of Antibiotic Therapy. *Chest J*. 1968;53(4):481-486. doi:10.1378/chest.53.4.481
116. Bagley ST. Habitat association of Klebsiella species. *Infect Control*. 1985;6(2):52-58. doi:10.1017/S0195941700062603
117. Matsen JM, Spindler JA, Blosser RO. Characterization of Klebsiella Isolates from Natural Receiving Waters and Comparison with Human Isolates. *Appl Microbiol*. 1974;28:672-678. doi:10.1128/aem.28.4.672-678.1974
118. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767057>
119. Marr CM, Russo TA. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae: a new public health threat. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(2):71-73. doi:10.1080/14787210.2019.1555470
120. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. Klebsiella pneumoniae: a

- major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):252-275. doi:10.1093/femsre/fux013
121. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):736-755. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x
 122. Goren MG, Carmeli Y, Schwaber MJ, Chmelnitsky I, Schechner V, Navon-Venezia S. Transfer of carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(6):1014-1017. doi:10.3201/eid1606.091671
 123. Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, et al. Horizontal transfer of blaCMY-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(2):534-541. doi:10.1128/AAC.50.2.534-541.2006
 124. Warnes SL, Highmore CJ, Keevil CW, Bassler B. Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes on Abiotic Touch Surfaces: Implications for Public Health. Published online 2012. doi:10.1128/mBio.00489-12
 125. Rossolini GM, Arena F, Giani T. Mechanisms of Antibacterial Resistance. In: *Infectious Diseases, 2-Volume Set.* Elsevier; 2017:1181-1196.e1. doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00138-6
 126. Livermore DM. *B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance.* Vol 8.; 1995.
 127. Jacoby GA. AmpC B-Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161-182. doi:10.1128/CMR.00036-08
 128. Zamorano L, Miró E, Juan C, et al. Mobile genetic elements related to the diffusion of plasmid-mediated AmpC β -lactamases or carbapenemases from enterobacteriaceae: Findings from a multicenter study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(9):5260-5266. doi:10.1128/AAC.00562-15
 129. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile-Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-458. doi:10.1128/CMR.00001-07
 130. Mathers AJ, Stoesser N, Sheppard AE, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* at a single institution: insights into endemicity from whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(3):1656-1663. doi:10.1128/AAC.04292-14
 131. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565-591. doi:10.1128/CMR.00116-14
 132. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151-1161.

doi:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001

133. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol.* 2016;7:895. doi:10.3389/fmicb.2016.00895
134. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* Published online 2017. doi:10.1093/femsre/fux013
135. Sidjabat HE, Silveira FP, Potoski BA, et al. Interspecies spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene in a single patient. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1736-1738. doi:10.1086/648077
136. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis.* 2005;40(9):1333-1341. doi:10.1086/429323
137. Arena F, Henrici De Angelis L, Cannatelli A, et al. Colistin Resistance Caused by Inactivation of the MgrB Regulator Is Not Associated with Decreased Virulence of Sequence Type 258 KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(4):2509-2512. doi:10.1128/AAC.02981-15
138. Bradford PA, Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Wise MG, Hackel M, Sahm DF. Correlation of β -lactamase production and colistin resistance among Enterobacteriaceae isolates from a global surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(3):1385-1392. doi:10.1128/AAC.01870-15
139. De Majumdar S, Yu J, Fookes M, et al. Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. *PLoS Pathog.* 2015;12(5). doi:10.1371/journal.ppat.1004627
140. Gu D, Dong N, Zheng Z, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(1):37-46. doi:10.1016/S1473-3099(17)30489-9
141. Yao H, Qin S, Chen S, et al. Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(1):24. doi:10.1016/S1473-3099(17)30625-4
142. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-796. doi:10.1016/S1473-3099(13)70190-7
143. van Duin D, Arias CA, Komarow L, et al. Molecular and clinical epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacterales in the USA (CRACKLE-2): a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20:731-741. doi:10.1016/S1473-3099(19)30755-8
144. Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, et al. Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258

- Klebsiella pneumoniae Pandemic. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133727. doi:10.1371/journal.pone.0133727
145. Lopez-Camacho E, Gomez-Gil R, Tobes R, et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a Klebsiella pneumoniae outbreak including carbapenem and colistin resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(3):632-636. doi:10.1093/jac/dkt419
 146. van Duin D, Cober ED, Richter SS, et al. Tigecycline therapy for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae (CRKP) bacteriuria leads to tigecycline resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(12):O1117-20. doi:10.1111/1469-0691.12714
 147. Mmatli M, Mbelle NM, Maningi NE, Osei Sekyere J. Emerging Transcriptional and Genomic Mechanisms Mediating Carbapenem and Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae: a Systematic Review of Current Reports. *mSystems*. 2020;5. doi:10.1128/mSystems.00783-20
 148. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, et al. Infections caused by KPC-producing Klebsiella pneumoniae: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(7):2133-2143.
 149. Gutiérrez-Gutiérrez B, Salamanca E, de Cueto M, et al. A Predictive Model of Mortality in Patients With Bloodstream Infections due to Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Mayo Clin Proc*. 2016;91:1362-1371. doi:10.1016/j.mayocp.2016.06.024
 150. Corso, A., Lucero, C., Tuduri, E., & Pasteran F. *Vigilancia de La Resistencia a Los Antimicrobianos Red Latinoamericana de Vigilancia de La Resistencia a Los Antimicrobianos (ReLAVRA)*.; 2018. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2019/12/INFORME-RESISTENCIA-ARGENTINA-2018.pdf>
 151. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, et al. Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(7):1178-1180. doi:10.3201/eid1407.070826
 152. Cejas D, Elena A, Guevara Nunez D, et al. Changing epidemiology of KPC-producing Klebsiella pneumoniae in Argentina: Emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;18:238-242. doi:10.1016/j.jgar.2019.06.005
 153. Paczosa MK, Mecsas J. Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629-661. doi:10.1128/MMBR.00078-15
 154. Opoku-Temeng C, Malachowa N, Kobayashi SD, Deleo FR. Innate Host Defense against Klebsiella pneumoniae and the Outlook for Development of Immunotherapies. *J Innate Immun*. 2022;14:167-181. doi:10.1159/000518679
 155. Bengoechea JA, Pessoa JS, Sa Pessoa J. Klebsiella pneumoniae infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(2):123-144. doi:10.1093/femsre/fuy043

156. Laichalk LL, Bucknell KA, Huffnagle GB, et al. Intrapulmonary delivery of tumor necrosis factor agonist peptide augments host defense in murine gram-negative bacterial pneumonia. *Infect Immun*. 1998;66:2822-2826. doi:10.1128/iai.66.6.2822-2826.1998
157. Moore TA, Lau HY, Cogen AL, Standiford TJ. Defective innate antibacterial host responses during murine *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 deficiency versus therapy with anti-TNF-alpha. *Clin Infect Dis*. 2005;41 Suppl 3:S213-7. doi:10.1086/430126
158. Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Zeng X, Krieg AM, Standiford TJ. CpG oligodeoxynucleotides stimulate protective innate immunity against pulmonary *Klebsiella* infection. *J Immunol*. 2004;173(8):5148-5155. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470059>
159. Bhan U, Lukacs NW, Osterholzer JJ, et al. TLR9 Is Required for Protective Innate Immunity in Gram-Negative Bacterial Pneumonia: Role of Dendritic Cells. *J Immunol*. 2007;179:3937-3946. doi:10.4049/jimmunol.179.6.3937
160. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*. 2011;478:515-518. doi:10.1038/nature10429
161. Karaolis DKR, Newstead MW, Zeng X, et al. Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia. *Infect Immun*. 2007;75:4942-4950. doi:10.1128/IAI.01762-06
162. Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine *Klebsiella* pneumonia. *J Infect Dis*. 1996;173(1):159-165. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8537653>
163. Broug-Holub E, Toews GB, van Iwaarden JF, et al. Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella* pneumonia: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infect Immun*. 1997;65(4):1139-1146. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9119443>
164. Xiong H, Carter RA, Leiner IM, et al. Distinct Contributions of Neutrophils and CCR2+ Monocytes to Pulmonary Clearance of Different *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Infect Immun*. 2015;83(9):3418-3427. doi:10.1128/IAI.00678-15
165. Ahn D, Penaloza H, Wang Z, et al. Acquired resistance to innate immune clearance promotes *Klebsiella pneumoniae* ST258 pulmonary infection. *JCI Insight*. 2016;1(17):e89704. doi:10.1172/jci.insight.89704
166. Alvarez D, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ, Alberti S. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect Immun*. 2000;68(2):953-955. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639470>
167. Merino S, Camprubi S, Alberti S, Benedi VJ, Tomas JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect*

Immun. 1992;60:2529-2535. doi:10.1128/iai.60.6.2529-2535.1992

168. de Astorza B, Cortes G, Crespi C, Saus C, Rojo JM, Alberti S. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect Immun.* 2004;72(3):1767-1774. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977986>
169. Kobayashi SD, Porter AR, Dorward DW, et al. Phagocytosis and Killing of Carbapenem-Resistant ST258 *Klebsiella pneumoniae* by Human Neutrophils. *J Infect Dis.* 2016;213(10):1615-1622. doi:10.1093/infdis/jiw001
170. Regueiro V, Campos MA, Pons J, Alberti S, Bengoechea JA. The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. *Microbiology.* 2006;152(Pt 2):555-566. doi:10.1099/mic.0.28285-0
171. Pan YJ, Lin TL, Hsu CR, Wang JT. Use of a Dictyostelium model for isolation of genetic loci associated with phagocytosis and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 2011;79(3):997-1006. doi:10.1128/IAI.00906-10
172. Domenico P, Salo RJ, Cross AS, Cunha BA. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 1994;62(10):4495-4499. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927714>
173. Diago-Navarro E, Motley MP, Ruiz-Peréz G, et al. Novel, broadly reactive anticapsular antibodies against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* protect from infection. *MBio.* 2018;9. doi:10.1128/mBio.00091-18
174. Peñaloza HF, Ahn D, Schultz BM, Piña-Iturbe A, González LA, Bueno SM. L-Arginine Enhances Intracellular Killing of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 by Murine Neutrophils. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10. doi:10.3389/fcimb.2020.571771
175. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1485-1493. doi:10.1128/AAC.01275-10
176. March C, Moranta D, Regueiro V, et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 2011;286(12):9956-9967. doi:10.1074/jbc.M110.181008
177. Lee CH, Chang CC, Liu JW, Chen RF, Yang KD. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. *Virulence.* 2014;5(6):673-679. doi:10.4161/viru.32076
178. Doorduyn DJ, Rooijackers SH, van Schaik W, Bardoel BW. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology.* 2016;221(10):1102-1109. doi:10.1016/j.imbio.2016.06.014

179. Jondle CN, Gupta K, Mishra BB, Sharma J. *Klebsiella pneumoniae* infection of murine neutrophils impairs their efferocytic clearance by modulating cell death machinery. *PLoS Pathog.* 2018;14(10):e1007338. doi:10.1371/journal.ppat.1007338
180. Willingham SB, Allen IC, Bergstralh DT, et al. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) Facilitates In Vivo Caspase-1 Activation, Necrosis, and HMGB1 Release via Inflammasome-Dependent and -Independent Pathways. *J Immunol.* 2009;183:2008-2015. doi:10.4049/jimmunol.0900138
181. Greco E, Quintiliani G, Santucci MB, et al. Janus-faced liposomes enhance antimicrobial innate immune response in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109. doi:10.1073/pnas.1200484109
182. Fevre C, Almeida AS, Taront S, et al. A novel murine model of rhinoscleroma identifies Mikulicz cells, the disease signature, as IL-10 dependent derivatives of inflammatory monocytes. *EMBO Mol Med.* 2013;5:516-530. doi:10.1002/emmm.201202023
183. Fodah RA, Scott JB, Tam HH, et al. Correlation of *Klebsiella pneumoniae* comparative genetic analyses with virulence profiles in a murine respiratory disease model. *PLoS One.* 2014;9(9):e107394. doi:10.1371/journal.pone.0107394
184. Cano V, March C, Insua JL, et al. *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. *Cell Microbiol.* 2015;17(11):1537-1560. doi:10.1111/cmi.12466
185. Dolgachev V, Panicker S, Balijepalli S, et al. Electroporation-mediated delivery of FER gene enhances innate immune response and improves survival in a murine model of pneumonia. *Gene Ther.* 2018;25(5):359-375. doi:10.1038/s41434-018-0022-y
186. Ohama H, Asai A, Ito I, et al. M2b macrophage elimination and improved resistance of mice with chronic alcohol consumption to opportunistic infections. *Am J Pathol.* 2015;185(2):420-431. doi:10.1016/j.ajpath.2014.09.022
187. Tsuchimoto Y, Asai A, Tsuda Y, et al. M2b Monocytes Provoke Bacterial Pneumonia and Gut Bacteria–Associated Sepsis in Alcoholics. *J Immunol.* 2015;195(11):5169-5177. doi:10.4049/jimmunol.1501369
188. Yoshida K, Matsumoto T, Tateda K, Uchida K, Tsujimoto S, Yamaguchi K. Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol.* 2000;49(11):1003-1010. doi:10.1099/0022-1317-49-11-1003
189. Yoshida K, Matsumoto T, Tateda K, Uchida K, Tsujimoto S, Yamaguchi K. Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection. *J Med Microbiol.* 2001;50(5):456-461. doi:10.1099/0022-1317-50-5-456
190. Frank CG, Reguerio V, Rother M, et al. *Klebsiella pneumoniae* targets an EGF receptor-dependent pathway to subvert inflammation. *Cell Microbiol.*

2013;15(7):1212-1233. doi:10.1111/cmi.12110

191. Regueiro V, Moranta D, Frank CG, et al. *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. *Cell Microbiol.* 2011;13(1):135-153. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01526.x
192. Tzouvelekis LS, Miriagou V, Kotsakis SD, et al. KPC-producing, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 as a typical opportunistic pathogen. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(10):5144-5146. doi:10.1128/AAC.01052-13
193. Huff J, Czyz A, Landick R, Niederweis M. Taking phage integration to the next level as a genetic tool for mycobacteria. *Gene.* 2010;468(1-2):8. doi:10.1016/J.GENE.2010.07.012
194. A. B. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:7(Introduction).
195. Leech, Hutchinson, Holdsworth, Morand. Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil migration and synovial P-selectin but not neutrophil phagocytic or oxidative function in experimental arthritis. *Clin Exp Immunol.* 1998;112(3):383-388. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00601.x
196. Betsuyaku T, Liu F, Senior RM, et al. A functional granulocyte colony-stimulating factor receptor is required for normal chemoattractant-induced neutrophil activation. *J Clin Invest.* 1999;103(6):825-832. doi:10.1172/JCI5191
197. Abell-King C, Pokhrel A, Rice SA, Duggin IG, Söderström B. Multispecies bacterial invasion of human host cells. *Pathog Dis.* Published online May 24, 2024. doi:10.1093/FEMSPD/FTAE012
198. Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An Extracellular Matrix-Based Mechanism of Rapid Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2013;190(8):4136-4148. doi:10.4049/jimmunol.1202671
199. Maouia A, Rebetz J, Kapur R, Semple JW. The Immune Nature of Platelets Revisited. *Transfus Med Rev.* 2020;34(4):209-220. doi:10.1016/j.tmr.2020.09.005
200. Hally KE, Bird GK, la Flamme AC, Harding SA, Larsen PD. Platelets modulate multiple markers of neutrophil function in response to in vitro Toll-like receptor stimulation. *PLoS One.* 2019;14(10). doi:10.1371/journal.pone.0223444
201. Herant M, Heinrich V, Dembo M. Mechanics of neutrophil phagocytosis: Behavior of the cortical tension. *J Cell Sci.* 2005;118(9):1789-1797. doi:10.1242/jcs.02275
202. Parent CA. Making all the right moves: Chemotaxis in neutrophils and Dictyostelium. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(1):4-13. doi:10.1016/j.ceb.2003.11.008
203. Shen YC, Chen CF, Wang SY, Sung YJ. Impediment to calcium influx and

- reactive oxygen production accounts for the inhibition of neutrophil Mac-1 up-regulation and adhesion by tetrandrine. *Mol Pharmacol*. 1999;55(1):186-193. doi:10.1124/mol.55.1.186
204. Birnberg-Weiss F, Castillo LA, Pittaluga JR, et al. Modulation of neutrophil extracellular traps release by *Klebsiella pneumoniae*. *J Leukoc Biol*. 2020;109(June):1-12. doi:10.1002/JLB.4MA0620-099R
 205. Smith WPJ, Wucher BR, Nadell CD, Foster KR. Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21:519-534. doi:10.1038/s41579-023-00877-3
 206. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008;197:1079-1081. doi:10.1086/533452
 207. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11:297-308. doi:10.1586/eri.13.12
 208. Bonomo RA, Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Vila AJ. The Real Crisis in Antimicrobial Resistance: Failure to Anticipate and Respond. *Clin Infect Dis*. Published online January 30, 2024. doi:10.1093/CID/CIAD758
 209. David S, Reuter S, Harris SR, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol*. 2019;4(11):1919-1929. doi:10.1038/s41564-019-0492-8
 210. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3365-3370. doi:10.1128/AAC.00126-09
 211. Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(10):1520-1524. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03600.x
 212. Gomez-Simmonds A, Greenman M, Sullivan SB, et al. Population Structure of *Klebsiella pneumoniae* Causing Bloodstream Infections at a New York City Tertiary Care Hospital: Diversification of Multidrug-Resistant Isolates. *J Clin Microbiol*. 2015;53(7):2060-2067. doi:10.1128/JCM.03455-14
 213. Akturk H, Sutcu M, Somer A, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. *Braz J Infect Dis*. 2016;20(2):134-140. doi:10.1016/j.bjid.2015.12.004
 214. Borer A, Saidel-Odes L, Riesenber K, et al. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30(10):972-976. doi:10.1086/605922
 215. Jiao Y, Qin Y, Liu J, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization and predictors of mortality: a retrospective study. *Pathog Glob Heal*. 2015;109(2):68-74.

doi:10.1179/2047773215Y.0000000004

216. Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: A review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:11-32. doi:10.1186/1476-0711-11-32
217. Tuon FF, Rocha JL, Toledo P, et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Brazilian J Infect Dis.* 2012;16(5):416-419. doi:10.1016/j.bjid.2012.08.006
218. Bai R, Guo J. Interactions and Implications of *Klebsiella pneumoniae* with Human Immune Responses and Metabolic Pathways: A Comprehensive Review. *Infect Drug Resist.* 2024;17:449-462. doi:10.2147/IDR.S451013
219. Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial Resistance (AMR). *Br J Biomed Sci.* 2023;80:11387. doi:10.3389/bjbs.2023.11387
220. Pan YJ, Lin TL, Chen YH, et al. Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by *wzc* sequencing. *PLoS One.* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0080670
221. Opoku-Temeng C, Kobayashi SD, DeLeo FR. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:1360-1366. doi:10.1016/j.csbj.2019.09.011
222. Tatsiy O, McDonald PP. Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. *Front Immunol.* 2018;9:2036. doi:10.3389/fimmu.2018.02036
223. Douradinha B. Exploring the journey: A comprehensive review of vaccine development against *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Res.* 2024;287. doi:10.1016/j.micres.2024.127837
224. Maddur MS, Lacroix-Desmazes S, Dimitrov JD, Kazatchkine MD, Bayry J, Kaveri S V. Natural Antibodies: from First-Line Defense Against Pathogens to Perpetual Immune Homeostasis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58:213-228. doi:10.1007/s12016-019-08746-9
225. Wantuch PL, Rosen DA. *Klebsiella pneumoniae*: adaptive immune landscapes and vaccine horizons. *Trends Immunol.* 2023;44:826-844. doi:10.1016/j.it.2023.08.005
226. Landoni VI, Pittaluga JR, Carestia A, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induced by Shiga Toxin and Lipopolysaccharide-Treated Platelets Exacerbate Endothelial Cell Damage. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12. doi:10.3389/fcimb.2022.897019
227. Carestia A, Kaufman T, Schattner M. Platelets: New Bricks in the Building of Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol.* 2016;7:271. doi:10.3389/fimmu.2016.00271
228. Giovane RA, Brooks S. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Co-Infections with *Klebsiella*; a Retrospective Study. *Int Arch Med.* 2015;8. doi:10.3823/1738

229. Okada F, Ando Y, Honda K, et al. Acute *Klebsiella pneumoniae* pneumonia alone and with concurrent infection: comparison of clinical and thin-section CT findings. *Br J Radiol*. 2010;83(994):854-860. doi:10.1259/bjr/28999734
230. Koupaei M, Asadi A, Mahdizade Ari M, et al. Secondary *Klebsiella pneumoniae* infection in patients with COVID-19: A systematic review. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2024;108(2). doi:10.1016/J.DIAGMICROBIO.2023.116105
231. Yahya RO. Problems Associated with Co-Infection by Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in COVID-19 Patients: A Review. *Healthc 2022, Vol 10, Page 2412*. 2022;10(12):2412. doi:10.3390/HEALTHCARE10122412
232. Storey D, McNally A, Åstrand M, et al. *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated microbial competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. *PLoS Pathog*. 2020;16(3). doi:10.1371/journal.ppat.1007969
233. Sá-Pessoa J, López-Montesino S, Przybyszewska K, et al. A trans-kingdom T6SS effector induces the fragmentation of the mitochondrial network and activates innate immune receptor NLRX1 to promote infection. *Nat Commun*. 2023;14. doi:10.1038/s41467-023-36629-3
234. Guilhen C, Miquel S, Charbonnel N, et al. Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2019;5:25. doi:10.1038/s41522-019-0098-1
235. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3:948-958. doi:10.1038/nrmicro1289
236. Staali L, Bauer S, Mörgelin M, Björck L, Tapper H. *Streptococcus pyogenes* bacteria modulate membrane traffic in human neutrophils and selectively inhibit azurophilic granule fusion with phagosomes. *Cell Microbiol*. 2006;8:690-703. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00662.x
237. Simons MP, Nauseef WM, Apicella MA. Interactions of *Neisseria gonorrhoeae* with adherent polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*. 2005;73:1971-1977. doi:10.1128/IAI.73.4.1971-1977.2005
238. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res*. 2011;21(2):290-304. doi:10.1038/cr.2010.150
239. Nourshargh S, Renshaw SA, Imhof BA. Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why? *Trends Immunol*. 2016;37:273-286. doi:10.1016/j.it.2016.03.006
240. Kamoshida G, Tansho-Nagakawa S, Kikuchi-Ueda T, et al. A novel bacterial transport mechanism of *Acinetobacter baumannii* via activated human neutrophils through interleukin-8. *J Leukoc Biol*. 2016;100(6):1405-1412. doi:10.1189/jlb.4ab0116-023rr