



Caracterización de células CD11c⁺ durante la infección por *Fasciola hepatica*

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias

Sofía Frigerio Liddle

Orientadora: Dra. Teresa Freire, Departamento de Inmunobiología,
Facultad de Medicina.

Abril de 2017

Índice

Índice.....	1
Agradecimientos.....	3
Lista de abreviaturas.....	4
Resumen.....	5
1. Introducción.....	6
- Características generales de los parásitos helmintos.....	6
- Fasciolosis.....	7
- Fasciolosis en Uruguay.....	8
- Agente Causal y Ciclo de Vida.....	8
- Control y tratamiento.....	11
- Características Generales del Sistema Inmune de los mamíferos.....	12
- Función y características de las DCs.....	13
- Características de las DCs en el hígado murino.....	15
- Activación de linfocitos T y diferenciación hacia diferentes subtipos efectoros.....	15
- Inmunomodulación por parásitos helmintos.....	17
- Expresión de marcadores en la DC durante la infección por <i>Fasciola hepatica</i>	19
- MHCII y moléculas asociadas con su síntesis, endocitosis, expresión y degradación.....	20
-MGL.....	23
Objetivo General.....	25
Objetivos Específicos.....	25
2. Materiales y Métodos.....	26
- Modelo murino de infección por <i>F. hepatica</i>	26
- Obtención de suspensiones celulares de PEC y bazo.....	26
- Purificación de células CD11c ⁺	27
- Congelamiento de hígados.....	27
- Obtención de cortes histológicos de hígado para inmunofluorescencia.....	27
- Análisis por microscopía.....	27
- Extracción de ARN, cuantificación y medida de pureza.....	28
- Síntesis de ADN copia (ADNc).....	29
- PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	30
- Análisis por citometría de flujo.....	30
- Ensayo de localización y endocitosis de la molécula de MHCII.....	31
3. Resultados.....	32
- Características del hígado murino durante la infección por <i>F. hepatica</i>	32
- Identificación de células CD11c ⁺ MGL2 ⁺ y células F4/80 ⁺ MGL2 ⁺ en hígado.....	33
- de animales infectados.....	

- Identificación de células MGL2 ⁺ en PEC de animales infectados.....	35
- Expresión de MHCII en células CD11c ⁺ medida por citometría de flujo.....	36
- Evaluación de la expresión génica de MHCII, MHCI y CIITA en células CD11c ⁺ peritoneales.....	36
- Evaluación de la expresión génica de MARCH1 en células CD11 ⁺ peritoneales.....	37
- Análisis de la localización y endocitosis del MHCII por microscopía en.....	37
células CD11c ⁺ peritoneales.....	
4. Discusión.....	47
5. Conclusiones.....	52
6. Bibliografía.....	54

Agradecimientos

A mis padres y mi hermana, por apoyarme en todas mis decisiones y también en cada etapa de mi carrera. Por escucharme cada vez que necesitaba un consejo.

A Teresa, por darme la oportunidad de integrarme a este equipo de trabajo, por su gran esfuerzo y dedicación a la hora de transmitirme sus conocimientos y por siempre hacerse un tiempo para enseñarme y contribuir con mi formación.

A mis amigos por también estar presente en todos los momentos, ya sean fáciles o difíciles y aconsejarme siempre. Por escucharme aunque no entiendan del tema que les hablo.

A mis compañeros de laboratorio; Valeria, Natalie, Verónica, Paula, Ernesto, Carolina y Florencia, por siempre estar dispuestos a ayudarme en todo lo que necesitaba y aguantar mis preguntas y dudas. También por hacer más agradables y divertidas las horas de trabajo.

Al resto de mi familia pero sobre todo a mi tío Pablo por haberme transmitido, tal vez sin haberlo querido, el gusto por la investigación. También por guiarme y resolver muchas de mis dudas.

A Mariana de Biofísica por su paciencia y las largas horas ayudándome a obtener las imágenes que aparecen en esta tesina.

A todos aquellos que de alguna forma u otra me acompañaron a lo largo de estos años en facultad, y que contribuyeron de alguna manera en la realización de este trabajo.

Lista de abreviaturas

ADNc – ADN copia
APC – Célula presentadora de antígeno
BSA – Seroalbúmina bovina
cDC – Célula Dendrítica convencional
CIITA – Transactivador del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II
CLR – Receptor Lectina tipo C
DAPI – 4', 6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride
DC – Célula Dendrítica
DILAVE – División de Laboratorios Veterinarios
EAE – Encefalitis Experimental Autoinmune
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA – Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FhTE – Extracto total de gusanos adultos de *Fasciola hepatica*
GalNAc – N-acetil Galactosamina
GAPDH – Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HCV – Virus de la Hepatitis C
IFN- γ – Interferón gamma
IgE – Inmunoglobulina E
IL- – Interleuquina
ILC – Célula Linfoide Innata
INAC – Instituto Nacional de Carnes
INIA – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
LTC – Linfocito T Citotóxico
MARCH – membrane-associated RING-CH
MGL – Lectina de macrófagos específico para Gal/GalNAc
MHC – Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Mo-DC – Células Dendríticas derivadas de monocitos
OMS – Organización Mundial de la Salud
PAMP – Patrón Molecular derivado de Patógenos
PBS – Buffer Fosfato Salino
pDC – Célula Dendrítica plasmocitoide
PECs – Células del exudado de la cavidad peritoneal
PRR – Receptor de reconocimiento de Patógenos
qRT-PCR – PCR cuantitativa en tiempo real
TGF- β – Factor de crecimiento tumoral beta
Th – Linfocito T CD4⁺ colaborador
TLR – Receptor de tipo Toll
TNF- α – Factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

La infección por el parásito helminto *F. hepatica* afecta principalmente a los animales rumiantes produciendo grandes pérdidas económicas. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indican que la infección por *F. hepatica* en ratones genera un reclutamiento de células CD11c⁺ hacia la cavidad peritoneal. Dichos estudios también informan que estas células CD11c⁺ se caracterizan por expresar altos niveles de MGL2 y bajos niveles de MHCII. Además, producen IL-10 y TNF- α , mostrando un fenotipo tolerogénico. Esto lleva a la polarización hacia el subtipo Th2/Treg de linfocitos T. Uno de los objetivos de esta tesina fue profundizar en la identificación de las células CD11c⁺ MGL2⁺ y abordar su caracterización en el hígado. Para ello, se realizaron inmunofluorescencias de hígado y de células del exudado de la cavidad peritoneal (PEC) de ratones infectados y se las analizó por microscopía, comparando con los tejidos provenientes de ratones control (naive). Se utilizaron anticuerpos anti-CD11c, -MGL2 y -F4/80. Los resultados obtenidos indican que en el hígado de animales infectados es posible encontrar células tanto CD11c⁺ MGL2⁺ como F4/80⁺ MGL2⁺, mientras que las mismas se encuentran ausentes en hígados de animales naive. Asimismo, se evidenció la presencia de células MGL2⁺ en PEC de animales infectados, no estando presentes en PEC de animales naive. Por otro lado, en este trabajo también se profundizó en los posibles mecanismos moleculares que conducen a una disminución en la expresión de MHCII en células CD11c⁺ de animales infectados. Para este fin se purificaron células CD11c⁺ de la cavidad peritoneal tanto de animales infectados como de naive y se evaluó mediante qRT-PCR la expresión génica de MHCII así como de moléculas relacionadas que participan en la expresión o degradación del MHCII (CIITA, MARCH1). Finalmente, se estudió la endocitosis de MHCII que llevan a cabo las células CD11c⁺, cultivando las mismas con un anticuerpo anti-MHCII y luego observando las células con microscopio de epifluorescencia. Los resultados indican que la disminución en la expresión de MHCII de superficie en las células CD11c⁺ de los animales infectados podría deberse a una disminución de la expresión génica de MHCII, la cual podría estar causada por una baja de la expresión del gen de CIITA. Esta molécula es un factor de transcripción que controla la expresión de MHCII. A su vez, se vio que las células CD11c⁺ de los animales infectados podrían llevar a cabo una mayor degradación del MHCII, lo cual podría contribuir a la disminución del MHCII de superficie. Los resultados obtenidos en esta tesina colaboran con la presente caracterización de las células CD11c⁺ llevada a cabo en nuestro laboratorio, y brinda más información sobre los posibles mecanismos moleculares que contribuye a la disminución de la expresión de MHCII durante la infección por un parásito helminto, en particular *F. hepatica*.

1. Introducción

Generalidades sobre los parásitos helmintos

El parásito *Fasciola hepatica* pertenece a un grupo no taxonómico de organismos, ya sea parásitos o de vida libre, denominados helmintos. Los helmintos pueden clasificarse en dos grandes grupos: nematodos o gusanos redondos y platelmintos o gusanos planos. Estos últimos pueden a su vez clasificarse en cestodes o trematodos (1). Los hospederos definitivos e intermediarios de los helmintos son muy diversos, y pueden ir desde mamíferos hasta aves, reptiles, moluscos o artrópodos. Pueden localizarse en la luz del órgano o en tejidos como el intestino, el hígado (tanto en el parénquima como en los ductos biliares), los pulmones, los vasos linfáticos, entre otros (2).

En la actualidad, los parásitos helmintos representan unos de los agentes infecciosos más prevalentes a nivel mundial, siendo responsables de muchas enfermedades y síndromes (3), y se estima que aproximadamente un tercio de las casi 3 mil millones de personas que viven en las regiones en desarrollo del África sub-Sahariana, Asia y las Américas están infectadas con uno o más helmintos (4). Las helmintiasis más comunes son las causadas por infecciones por helmintos intestinales, como puede observarse en la Tabla 1 (1).

Tabla 1.1. Principales helmintiasis: prevalencia mundial y distribución. Extraído y modificado de (1).

Enfermedad	Agente Etiológico	Prevalencia Mundial	Regiones con alta prevalencia
Geohelmintiasis			
Ascariasis	<i>Ascaris lumbricoides</i>	807 millones	Regiones en desarrollo de África, Asia y América Latina
Tricuriasis	<i>Trichuris trichiura</i>	604 millones	Regiones en desarrollo de África, Asia y América Latina
Anquilostomiasis	<i>Necator americanus</i>	576 millones	Regiones en desarrollo de África, Asia y América Latina
Estrongiloidiasis	<i>Strongyloides stercoralis</i>	30-100 millones	Regiones en desarrollo de África, Asia y América Latina
Filariasis			
Filariasis linfática	<i>Wuchereria bancrofti</i> <i>Brugia malayi</i>	120 millones	Regiones en desarrollo de India, Sudeste Asiático, y África sub-sahariana
Oncocercosis	<i>Onchocerca volvulus</i>	37 millones	África sub-sahariana
Loiasis	<i>Loa Loa</i>	13 millones	África sub-sahariana
Dracunculiasis	<i>Dracunculus medinensis</i>	0,01 millones	África sub-sahariana
Plathelmintos			
Esquistosomiasis	<i>Schistosoma haematobium</i>	207 millones	África sub-sahariana
	<i>Schistosoma mansoni</i>		África sub-sahariana y este de Brasil
	<i>Schistosoma japonicum</i>		China y Sudeste Asiático
Trematodiasis transmitida por alimentos	<i>Clonorchis sinensis</i>	más de 60 millones	Regiones en desarrollo del Este Asiático
	<i>Opisthorchis viverrini</i>		
	<i>Paragonimus spp</i>		
	<i>Fasciolopsis buski</i>		
Cisticercosis	<i>Fasciola hepatica</i>	0,4 millones (Sólo en América Latina)	Regiones en desarrollo de África, Asia y América Latina y África sub-sahariana
	<i>Taenia solium</i>		

Se ha observado que en comparación con cualquier otro grupo etario, los niños en edad pre-escolar, escolar y adolescentes presentan un mayor riesgo de infección por gusanos intestinales. Como consecuencia de dichas infecciones se ha registrado un retardo en el crecimiento, así como también una disminución de la memoria y de la capacidad de razonamiento (1).

Además del gran impacto en la población humana, las infecciones por helmintos también afectan enormemente a animales productores como ovejas, cabras y ganado vacuno. Este hecho conduce a grandes pérdidas económicas a nivel mundial (5).

A pesar de todo esto, no se ha invertido lo necesario para la investigación o el desarrollo de nuevos tratamientos para las helmintiasis, y las mismas han sido relegadas, conociéndose como las principales “enfermedades tropicales desatendidas” (1).

Fasciolosis

La fasciolosis es una enfermedad zoonótica causada por los gusanos trematodes del género *Fasciola*, como *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* (6). La distribución de estas dos especies de *Fasciola* es diferente. *F. hepatica* ha sido encontrada en regiones templadas, como Australia, Gran Bretaña, Europa, las Américas y el este de África. Por otra parte, *F. gigantica* reside en regiones tropicales (sudeste asiático, India y África medio este y sub-Sahariana) (5) (Figura 1).

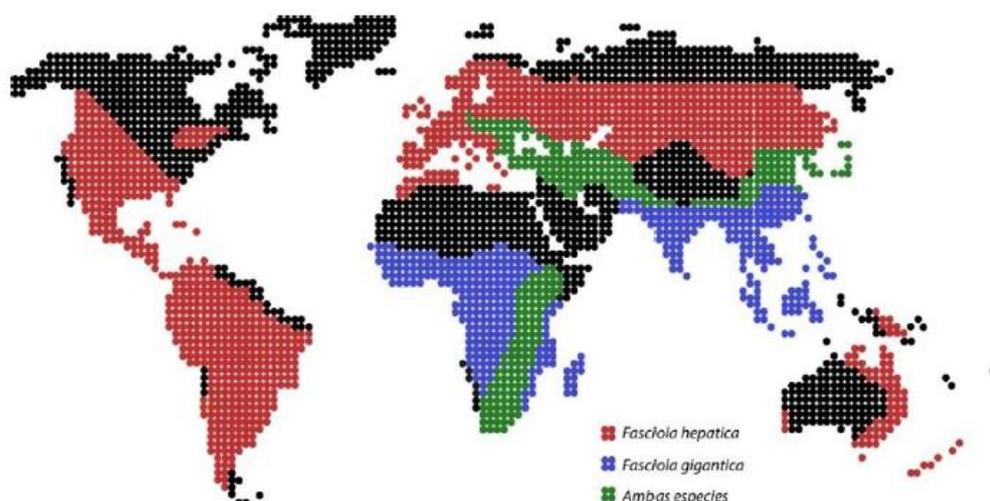


Figura 1.1. Distribución mundial de *F. hepatica* y *F. gigantica*, parásitos causantes de la fasciolosis. Extraído y modificado de (2).

La fasciolosis afecta a todos los animales rumiantes (ovejas, bovinos, búfalos y cabras), y el hecho de que se encuentra muy dispersa la hace una de las enfermedades por helmintos más importantes a nivel global. Se calcula que *F. hepatica* y *F. gigantica* son responsables de pérdidas globales de alrededor de 3 mil millones de dólares por año (7). Sin embargo, cuantificar las pérdidas es difícil debido a los bajos reportes de infecciones y los malos tests de diagnóstico que existían en el pasado.

Las pérdidas económicas se ven reflejadas en una disminución de la producción de leche, carne y lana y en una reducción de la fertilidad. Esto incluye además el costo de las drogas utilizadas en el tratamiento contra la fasciolosis, y las infecciones bacterianas secundarias que se originan por la infección con estos parásitos (5).

Aunque se ha visto que hay relación entre la fasciolosis en los animales productivos y la pobreza, las infecciones por especies de *Fasciola* en humanos han recibido poca atención (5). De hecho, fue considerada como una enfermedad secundaria hasta el final de la década de los 90, ya que solo se habían reportado 2000 casos en el período de 1970 a 1990 (8). Sin embargo, a finales de la década de 1980 la situación cambió, debido a que la Organización Mundial de la Salud (OMS) decidió dedicarse activamente a este tema, dado que se habían registrado reportes que afirmaban que la fasciolosis humana era más frecuente de lo que se pensaba, sobre todo en la región del altiplano boliviano (8). De esta manera, actualmente la OMS calcula que alrededor de 2 a 17 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas con especies de *Fasciola* y que 180 millones se encuentran en riesgo de infección (9).

Los mayores síntomas de la fasciolosis se correlacionan con el momento en el cual el gusano juvenil atraviesa la pared del intestino delgado, migra a través de la cavidad abdominal y finalmente invade el hígado y los ductos biliares. Importantes características clínicas de esta infección son lesiones hepáticas, fibrosis, inflamación crónica y obstrucción de los ductos biliares. Algunos de los síntomas más importantes de la fasciolosis son fiebre, dolor abdominal, urticaria, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, entre otros (16).

Fasciolosis en Uruguay

La fasciolosis en nuestro país es una zoonosis que posee una alta prevalencia en el ganado ovino y bovino y se focaliza preferentemente en áreas reducidas de los establecimientos agropecuarios. En dichos establecimientos, la prevalencia de *F. hepatica* es siempre superior en bovinos. Esto se debe a que los bovinos tienden a pastorear en áreas más húmedas y bajas que el ovino (10).

En cuanto a la prevalencia de la enfermedad, se realizaron estudios a nivel nacional por la Facultad de Veterinaria (UdelaR) que revelaron que de 40 establecimientos de la zona Norte y Este del país, un 62,5% tenía presencia de *F. hepatica* (11).

Al igual que a nivel mundial, *F. hepatica* también causa grandes pérdidas económicas para nuestro país. Uno de los ejemplos más significativos es el decomiso de hígados. Se estima que en la década del 70 un 52,85% de los hígados eran decomisados. Un estudio más reciente llevado a cabo en el año 2001 por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), el Instituto Nacional de Carnes (INAC) y la Universidad de Colorado (Estados Unidos) informó que a nivel de bovinos hay un 50% de decomisos de hígados, aunque no se especificaron las causas de dicho decomiso. El estudio de ovinos arrojó que el 63% de los hígados fueron decomisados, y que de ellos en un 19% se había detectado la presencia de *F. hepatica* (12).

Agente Causal y Ciclo de Vida

F. hepatica es un parásito platelminto trematodo, perteneciente a la subclase *Digenea*. Posee una forma característica lanceolada aplanada (Figura 2), además de dos ventosas, una bucal u oral y otra ventral.

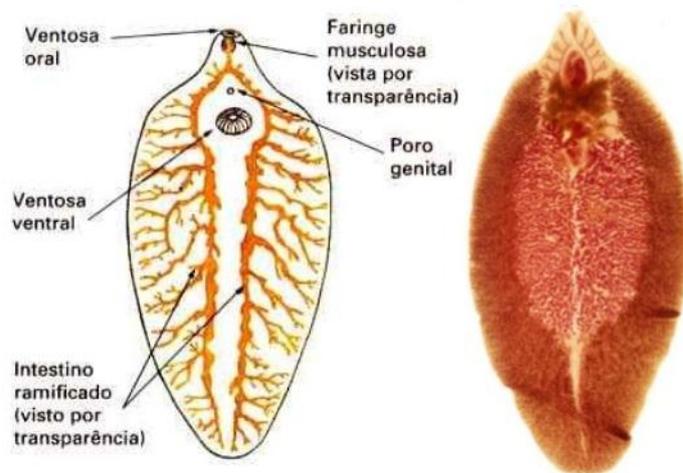


Figura 1.2. Estructura y morfología de un gusano adulto de *F. hepatica*. A la izquierda se muestra un esquema de la estructura de *F. hepatica* y a la derecha una fotografía del gusano adulto. Extraído y modificado de [www.ecured.cu/Fasciola hepatica](http://www.ecured.cu/Fasciola_hepatica).

El estado adulto del gusano presenta una forma plana sin segmentos de aproximadamente 2-3,5 cm de largo y 1-1,5 cm de ancho. El tegumento del adulto es de gran importancia en este parásito ya que constituye la frontera con el medio ambiente. El mismo es plegado e invaginado y presenta espinas que le permiten aumentar la superficie de absorción e intercambio con el hospedero definitivo (13). El adulto posee además un intestino incompleto formado por la cavidad bucal, faringe y esófago. Este último se bifurca formando dos ramas laterales que continúan hacia la parte posterior del parásito y terminan en los ciegos intestinales.

F. hepatica es un parásito hermafrodita con un útero corto y ovarios situados en posición anterior con respecto a los testículos.

En semejanza con otros parásitos helmintos, *F. hepatica* posee un ciclo de vida complejo y heteroxeno que necesita de un hospedero definitivo y otro intermediario (Figura 3). El hospedero definitivo lo constituyen los mamíferos herbívoros o el hombre. Los hospederos intermediarios pueden ser algunas especies de caracoles de agua dulce (11).

El gusano adulto se aloja en los ductos biliares del hospedero definitivo. Una vez allí, el parásito puede producir una gran cantidad de huevos (20.000 a 24.000 por gusano por día). Los mismos entran al duodeno con la bilis y son luego expulsados con las heces (14). Estos huevos, sin embargo, no se encuentran embrionados. Maduran luego de 9 a 15 días cuando se encuentran en un ambiente húmedo de entre 22°C a 25°C (11).

Cuando se reúnen las condiciones favorables de temperatura, humedad y presión de oxígeno, luego de 2 a 3 semanas se desarrolla un miracidio ciliado dentro del huevo. Dicho miracidio logra emerger del huevo por medio de enzimas que degradan y desprenden el opérculo del huevo. Una vez que logran eclosionar del huevo, nadan libremente mediante movimientos estimulados por la luz solar. Además, poseen un sistema de fototropismo y por eso cuentan

con estructuras oculares. Este punto es crítico en el ciclo, ya que el miracidio tiene 24 horas para encontrar a su hospedero intermediario. Si esto no ocurre en el tiempo establecido, el ciclo no continúa (15).

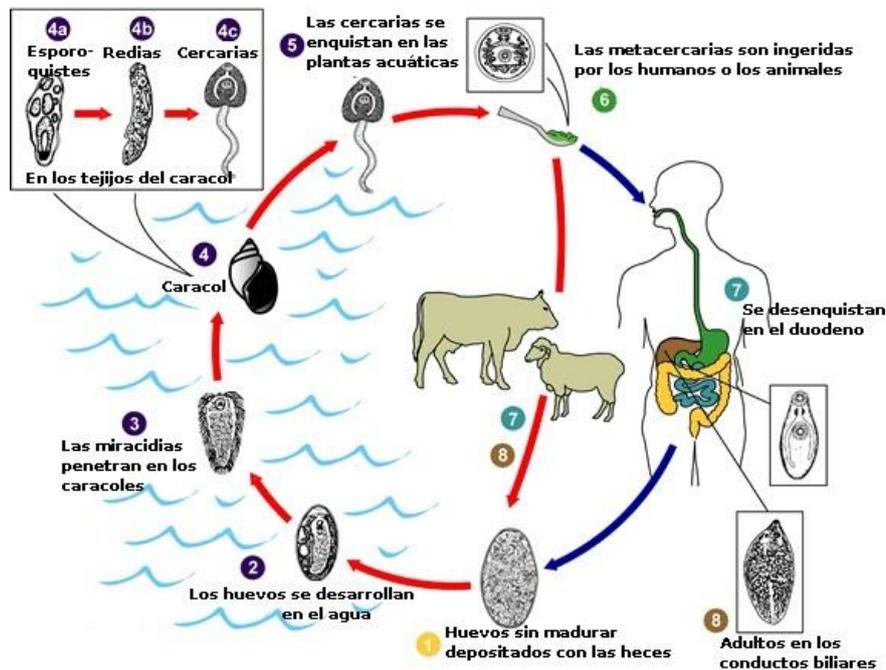


Figura 1.3. Ciclo de vida del parásito *F. hepatica*. El mismo requiere de dos tipos de hospederos, el intermediario (caracoles de agua dulce del género *Lymnea*) y el definitivo (bovinos, ovinos o el hombre). Una vez que los huevos maduran eliminan una larva llamada miracidio que infectará al caracol. Dentro del caracol la larva pasará por varios estadios hasta emerger como cercaria, la cual luego madura hasta el estadio metacercaria que es capaz de infectar al hospedero definitivo. Extraído de www.animalandia.educa.madrid.org/ficha.php?id=79.

Si el miracidio encuentra a su hospedero intermediario perfora sus células epiteliales mediante enzimas degradativas y penetra en el mismo. Los hospederos intermediarios son caracoles del género *Lymnaea* (15). En Uruguay, el principal caracol que actúa como hospedero intermediario es el denominado *Lymnaea viatrix*. Los caracoles que pertenecen a este género son anfibios que viven y se desarrollan en aguas poco profundas, como orillas de manantiales, tajamares y cañadas de corriente suave (11). El ganado bovino y ovino por lo general pastorea en estos ambientes, y es este el motivo por el cual presentan niveles tan altos de infección por *F. hepatica*.

Luego de que el miracidio entra en el caracol, pierde su cubierta ciliada y forma un esporocisto. El mismo consiste en una masa de células germinales. Cada una de estas células germinales es capaz de multiplicarse y formar una redia. Las redias crecen hasta que hacen estallar la pared del esporocisto y por lo tanto son liberadas en el hígado del caracol. Al igual que el esporocisto, la redia posee células germinales que se multiplican y producen el estadio larvario final, la cercaria (15). Todo el período desde que el miracidio penetra el caracol y se producen las cercarias lleva de 5 a 6 semanas (11).

Las cercarias tienen la particularidad de poseer una larga cola con la cual pueden nadar. De esta manera, la cercaria totalmente desarrollada deja el caracol de 4 a 7 semanas luego de la infección del mismo. Las cercarias nadan libremente en el agua y durante un período de pocos minutos a 2 horas se fijan en varios objetos, la mayoría de ellos plantas acuáticas. Seguidamente a la fijación, la cercaria pierde la cola y se enquista, formando una metacercaria, la cual es infectiva para el hospedero definitivo (15). En su ciclo natural se observó que de un miracidio que entra en el caracol, pueden desarrollarse más de 4.000 metacercarias. Dichas metacercarias pueden permanecer viables en el medio exterior por muchas semanas, dependiendo de la temperatura y la humedad (11).

El hospedero definitivo se infecta al ingerir una o más metacercarias. Cuando son ingeridas, la pared del quiste de la metacercaria es digerida en el intestino delgado en aproximadamente 1 hora. Los gusanos que emergen, llamados juveniles, penetran la pared del intestino delgado y aparecen en la cavidad abdominal en alrededor de 2 horas. Luego atraviesan el espacio peritoneal y alcanzan el hígado dentro de 4 a 6 días. Los juveniles migran por el parénquima del hígado donde permanecen 5 semanas, causando hemorragia extensiva y fibrosis. Finalmente alcanzan los ductos biliares, donde se vuelven sexualmente maduros y comienzan a depositar los huevos. A las 8 semanas luego de la infección, los huevos son encontrados en la bilis y luego en las heces, cerrando de esta manera el ciclo (15).

Control y tratamiento

Debido a las condiciones geográficas y climáticas de nuestro país, sería muy dificultoso erradicar al parásito definitivamente. Sin embargo, todavía no se ha logrado controlar las pérdidas productivas que se asocian a la fasciolosis (11).

La estrategia más significativa que se utiliza actualmente para tratar la enfermedad, consiste en emplear drogas fasciolicidas anti-helmínticas. De esta manera se está también disminuyendo la contaminación de las pasturas con huevos (16). Aunque los fármacos utilizados son efectivos, no evitan el daño hepático y los animales no desarrollan inmunidad protectora, por lo que se infectan fácilmente (17). En la actualidad se utilizan varios tipos de anti-helmínticos, con diferentes espectros de acción y efectividad. Uno de los más empleados, sobre todo en Europa, es el Triclabendazole, ya que tiene un amplio espectro de acción (sirve tanto para gusanos jóvenes como adultos) y además presenta una alta efectividad (11). El problema que tiene esta droga es que se ha registrado resistencia, principalmente en Europa, tornando ineficaz el tratamiento con la misma (17).

Teniendo en cuenta esta situación, es de gran interés la producción de una vacuna que genere inmunidad protectora contra la infección. En primer lugar, porque evitaría la administración continua de anti-helmínticos y con ésto se ahorraría tiempo y dinero. Además, los residuos químicos de los anti-helmínticos pueden aparecer en productos como carne y leche, y así provocar el rechazo de los consumidores, generando también pérdidas económicas (18).

Uno de los grandes problemas que existen a la hora de desarrollar una vacuna contra la fasciolosis es que los parásitos helmintos establecen infecciones crónicas de larga duración, y

que además generan una desregulación del sistema inmune del hospedador (3). Por lo tanto resulta fundamental conocer en profundidad cómo *F. hepatica* modula al sistema inmune, así como las moléculas que están involucradas en dicha inmunomodulación.

Hasta el momento, se presentó una revisión sobre la fasciolosis, las características morfológicas de su agente causal, su ciclo de vida y también los tratamientos que actualmente existen contra esta infección. A partir de aquí, se profundizará en los efectos que causa *F. hepatica* en el hospedero. En primer lugar, se realizará una breve introducción sobre el sistema inmune de los mamíferos, para continuar con las funciones y características de las células dendríticas (DCs). A continuación, se brindará una explicación básica sobre la activación de linfocitos T y su diferenciación hacia diferentes subtipos efectores. Seguidamente, se presentará lo que se conoce como inmunomodulación de los parásitos helmintos, y en relación a esto, se informará sobre los marcadores que expresan las DC en la infección por el parásito helmintho *F. hepatica*. Por otra parte, se presentará a la molécula MHCII así como moléculas asociadas con su expresión y degradación, como CIITA y MARCH1. Finalmente, se presentará a la molécula MGL y su relación con la inmunomodulación que lleva a cabo *F. hepatica*.

Características generales del sistema inmune de los mamíferos

El sistema inmune es un conjunto de células y moléculas efectoras encargadas de defender al organismo de diferentes agentes infecciosos, de la eliminación y renovación del tejido muerto o dañado, de la regulación de la respuesta inmune en diferentes situaciones, entre otras funciones (19). La característica fundamental de este sistema es que es capaz de diferenciar entre las células del organismo y estructuras o moléculas ajenas, y así desencadenar un proceso que se conoce como respuesta inmune. Esta respuesta es muy eficaz, ya que la mayoría de las veces no se desarrollan infecciones clínicamente evidentes, aun cuando existe una constante exposición a agentes patógenos (19).

El sistema inmune puede dividirse en dos grandes ramas, inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad innata (también llamada inmunidad natural o espontánea) representa la primera línea de defensa frente a los microbios y se compone de un conjunto de células y moléculas que ya se encontraban instauradas incluso antes de que se haya contraído la infección, y por lo tanto se encuentran prontas para actuar. Los principales componentes son:

- Barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas que secretan las células epiteliales.
- Células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células linfoides innatas (ILC) y células granulocíticas como eosinófilos, basófilos y mastocitos.
- Proteínas sanguíneas (sistema del complemento, proteínas de la cascada de la coagulación).
- Un grupo de proteínas llamadas citoquinas, producidas por las propias células del sistema inmune que regulan muchas de las funciones de las células nombradas anteriormente y de otras células que también participan en la respuesta inmune (20).

- DCs, cuya principal función es la de actuar como célula presentadora de antígeno (APC del inglés antigen presenting cell), presentando diferentes péptidos derivados de patógenos a los linfocitos T y regular la polarización de la respuesta de los mismos.

A diferencia de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa aumenta su capacidad defensiva con cada exposición al mismo microorganismo. Su nombre refiere al hecho de que dicha respuesta inmune aparece en reacción a una infección y se adapta a ella (20).

Los componentes principales de la inmunidad adaptativa son los linfocitos. Dichas células reconocen los antígenos de los patógenos y responden específicamente a ellos. Existen dos tipos de linfocitos predominantes: los linfocitos B y los linfocitos T. Los primeros reconocen antígenos extracelulares y luego se diferencian en células plasmáticas, las cuales se especializan en la producción de anticuerpos. Los linfocitos T reconocen solamente antígenos peptídicos lineales, que se encuentren unidos en una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC del inglés molecular histocompatibility complex) en la superficie de una APC. Dependiendo de qué tipo de patógeno se trate, el linfocito T se diferenciará a un determinado subtipo efector, que va a producir cierto tipo de citoquina. Las citoquinas, como se explicó más arriba, tienen variadas funciones muy importantes para el correcto control y eliminación del patógeno. Los linfocitos T también pueden diferenciarse a otro tipo de linfocito efector, que son los linfocitos T citotóxicos (LTC). Los mismos son capaces de matar directamente a una célula infectada o alterada (20).

Un aspecto que refleja la estrecha unión que existe entre ambos tipos de inmunidad, es el hecho de que el tipo de respuesta inmune innata que se genera, que a su vez es influenciada por el tipo de patógeno que ingresa al organismo, va a determinar qué tipo de respuesta inmune adaptativa se pone en marcha. En este sentido, el tipo celular que proporciona el nexo más significativo entre los dos tipos de respuesta inmune son las DCs (21).

Función y características de las DCs

Las DCs son células del sistema mononuclear fagocítico, y se desarrollan en la médula ósea a partir de los precursores comunes de DC que van a dar lugar a las DCs plasmocitoides (pDCs) y a un tipo celular intermedio que se conoce como DC pre-convencionales (pre-cDC). Luego de abandonar la médula ósea, las pre-cDCs circulan por un tiempo en la sangre y migran hacia tejidos linfoides y no linfoides donde se diferencian a cDCs. Las pDCs también ingresan a los tejidos desde la circulación, y lo hacen constitutivamente en el caso de los órganos linfático secundarios pero solo en el caso de inflamación en los órganos no linfoides (23).

Antiguamente, para diferenciar a las DCs de otros tipos celulares como los monocitos o macrófagos, se utilizaban criterios de adherencia y morfología. A partir de la década de 1970 se comenzaron a desarrollar los anticuerpos monoclonales, y a partir de su utilización se pudo determinar que la expresión de las moléculas CD11c y MHCII era un criterio adecuado para identificar a las DCs, quedando en desuso los criterios anteriores (24). Sin embargo, se debe considerar que las "DCs" identificadas con este método también incluyen algunos macrófagos tisulares que se ha visto que expresan CD11c y MHCII (25).

Shortman y colegas encontraron que las DCs $CD11c^+ MHCII^+$ en múltiples órganos linfoides podían dividirse en dos subsets. Un subset expresa $CD11b$ y $CD4$ mientras que el otro subset carece de estas moléculas pero expresa $CD8\alpha$ y $Xcr1$ (26). En el ratón, las DCs $CD11b^+$ y $CD8\alpha^+$ pertenecen al grupo de las DCs convencionales que habían sido nombradas anteriormente, y difieren de las DCs plasmocitoides, entre otras cosas porque estas últimas expresan muy baja cantidad de $MHCII$ (24). Finalmente, existe un tercer tipo de DC que aparece en condiciones de inflamación. Bajo estas condiciones, algunos monocitos que se extravasan de la circulación se diferencian a DCs, y por eso son llamadas DCs derivadas de monocitos (mo-DCs). Una vez que la inflamación se resuelve estas células desaparecen (23). En la figura 4 puede observarse un esquema que muestra los principales subsets de DC tanto en el ratón como en el humano.

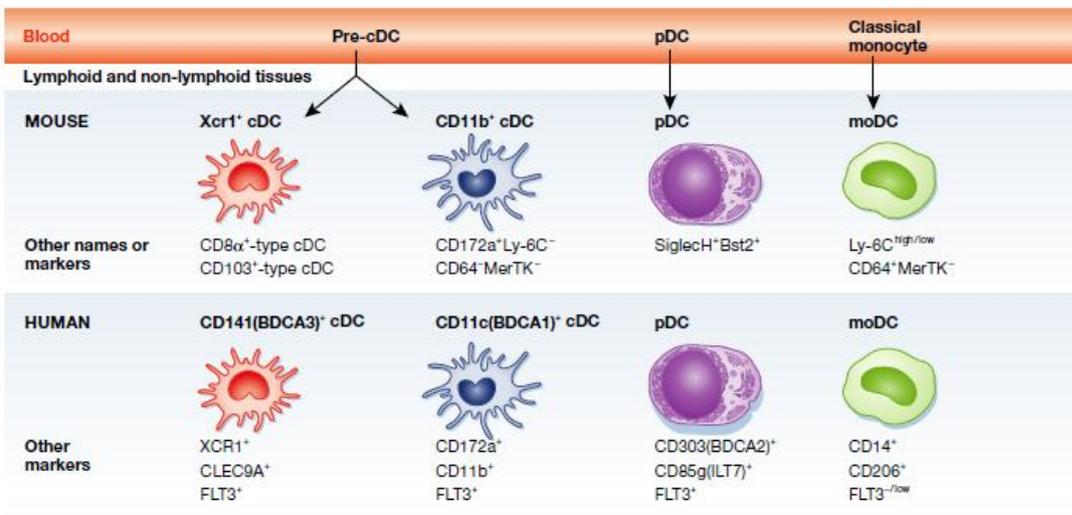


Figura 1.4. Tipos de DCs presentes tanto en ratón como en humano. Las DCs de ratón y humano pueden dividirse en cuatro subsets principales: $Xcr1^+$ cDCs, $CD11b^+$ cDCs, pDCs y moDCs. En la figura también se muestran los precursores que dan lugar a estos cuatro subsets así como otros marcadores alternativos que son usados para identificarlos. Extraído de (23).

Como se mencionó previamente, las DCs constituyen un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Uno de los motivos por el cual son tan importantes a la hora de relacionar ambos tipos de inmunidad es debido a su función, ya que son las APC más eficientes del sistema inmune (27). Esto se refleja, además, en que poseen la capacidad única de activar a los linfocitos T vírgenes.

Las DC se encuentran patrullando el organismo, migrando desde los tejidos a los órganos linfáticos. Cuando se encuentran con un patógeno, estas células deben internalizarlo y procesarlo, para así poder presentárselo a los linfocitos T e iniciar una respuesta inmune adecuada. Uno de los procesos fundamentales que se deben llevar a cabo cuando se produce el reconocimiento del patógeno por la DC, es la maduración y activación de dicha célula.

Previo al encuentro con el patógeno, la DC posee un fenotipo inmaduro. Este fenotipo se caracteriza por una baja expresión en la superficie de la célula de moléculas del $MHCII$ y moléculas coestimuladoras ($CD80$, $CD86$ y $CD40$) (23). En cuanto a la morfología, las células inmaduras poseen prolongaciones más cortas. En respuesta a la activación por una infección,

una injuria o una vacunación, las DCs ejecutan un programa de maduración y activación que las hace capaces de inducir la expansión clonal de los linfocitos T antígeno-específicos y su consecuente diferenciación a linfocitos T efectores (23).

La maduración y activación de la DC lleva a un aumento en la expresión en la membrana de MHCII y moléculas coestimuladoras, sus dendritas aumentan de tamaño y la célula adquiere una forma más estrellada. Además, poseen la capacidad de secretar citoquinas que determinan la activación diferencial de los linfocitos T (23). En cuanto a la función específica, las DCs maduras se encuentran especializadas en procesar y presentar antígenos, mientras que las DCs inmaduras se encuentran especializadas en capturar antígenos.

Características de las DCs en el hígado murino

El hígado está expuesto continuamente a antígenos derivados de los alimentos, por lo cual debe mantener un ambiente tolerogénico para no desarrollar respuestas inmunes frente a cada antígeno alimentario (28). Por este motivo, algunos patógenos hepáticos como el virus de la hepatitis C (HCV) o el parásito de la malaria generan infecciones persistentes en el hígado (29). *F. hepatica* también podría considerarse como un patógeno que afecta de manera crónica al hígado.

Dado estos antecedentes, se cree que el hígado posee DCs que se encuentran patrullando el tejido. Las mismas son DCs residentes en el hígado que expresan la molécula CD103. Se vio que estas DCs CD103⁺ juegan un rol crítico en el establecimiento de respuestas T CD8⁺ óptimas, ya que poseen una capacidad superior de procesar y presentar antígenos derivados de virus. También se observó que estas DCs que activan a los linfocitos T CD8⁺ no egresan hacia otros órganos como los linfonodos, por lo que activan a los linfocitos *in situ* (30).

Como se explicó anteriormente, *F. hepatica* es un parásito que infecta el hígado de diferentes mamíferos. Por lo tanto, es interesante la existencia de estas DCs residentes en el hígado, ya que podrían contactar con alguna estructura del parásito e iniciar respuestas inmunes para combatirlo. En este sentido, en esta tesina se estudió la presencia de DCs en el hígado que expresaban el marcador CD11c⁺ en hígados de ratones infectados con *F. hepatica* y en hígados de ratones no infectados (naive). También se buscó la presencia de otros marcadores en estas DCs hepáticas, como MGL2 y F4/80.

Activación de linfocitos T y diferenciación hacia diferentes subtipos efectores

En una primera instancia, las DCs reconocen estructuras de los patógenos que no están presentes en las células del huésped. Estas estructuras se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). El reconocimiento de los PAMPs se da por receptores que son llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y pueden encontrarse en la membrana plasmática de la DC, en su membrana endosomal, o en el citosol. También pueden ser secretados. La familia de PRRs clásicamente más estudiada en la DC son los receptores de tipo Toll (TLRs) (20). Existe otro tipo de receptores que han cobrado gran interés en la investigación actual y son los receptores lectina tipo C (CLRs). Este término hace referencia a un grupo de proteínas que reconocen y unen carbohidratos (lectinas) en forma dependiente

de calcio (31). Las DCs expresan una gran variedad de CLR en su membrana plasmática. Los mismos son capaces de reconocer carbohidratos derivados de moléculas de origen viral, bacteriano, fúngico o parasitario. Estos receptores poseen además la función de adhesión celular entre las DCs y células endoteliales o linfocitos T (32).

Una vez que el PAMP es reconocido, las DCs se activan presentando las características descritas anteriormente y migran desde el sitio donde reconocieron el PAMP hasta los órganos linfáticos secundarios, donde completan su maduración. La molécula microbiana reconocida sufre un proceso de proteólisis mediante el cual terminan generándose péptidos lineales de tamaño variable, que se unirán a moléculas del MHC de clase I y II, dependiendo de que la molécula patógena sea intracelular o extracelular, respectivamente. También pueden presentarse moléculas patógenas extracelulares en moléculas del MHC I por un proceso llamado presentación cruzada.

Todas las células nucleadas pueden expresar péptidos microbianos unidos a moléculas del MHC I, mientras que sólo las APC pueden presentar péptidos unidos a moléculas del MHC II. Esto significa que todas las células nucleadas del organismo pueden responder a una infección intracelular por un virus, por ejemplo (20).

Tabla 1.2. Tipos de células T efectoras con sus correspondientes funciones. Extraído de (22).

	Células T CD8 citotóxicas	Células T _H 1 CD4	Células T _H 2 CD4	Células T _H 17 CD4	Células T reguladoras CD4 (diversos tipos)
Tipos de células T efectoras					
Principales funciones en la respuesta inmunitaria adaptativa	Destrucción de células infectadas por virus	Activación de macrófagos infectados Ayuda a las células B para la producción de anticuerpo	Ayuda a las células B para la producción de anticuerpos, en especial el cambio a IgE	Intensificación de la respuesta de neutrófilos	Supresión de respuestas de células T
Patógenos contra los que actúan	Virus (p. ej. influenza, rabia, viruela bovina) Algunas bacterias intracelulares	Microorganismos que persisten en vesículas de macrófagos (p. ej. micobacterias, <i>Listeria</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Pneumocystis carinii</i>) Bacterias extracelulares	Helmintos	Bacterias extracelulares (p. ej. <i>Salmonella enterica</i>)	

En esta instancia, es importante aclarar que existen dos poblaciones mayoritarias de linfocitos T. Una de ellas posee la molécula CD4 en su membrana y la otra posee la molécula CD8. Dichas moléculas actúan como co-receptores del MHC. Los linfocitos T CD8⁺ reconocen complejos MHC I-péptido y se diferencian a LTCs, que son capaces de matar directamente a células infectada por virus, o células tumorales. Los linfocitos T CD4⁺ reconocen complejos MHC II-péptidos en la superficie de una APC y se diferencian a diferentes poblaciones efectoras, cada una con una determinada función (20).

El tipo de patógeno que invade el organismo va a activar diferentes tipos de receptores de la inmunidad innata, los cuales por diferentes vías de señalización determinarán que la célula produzca ciertas citoquinas. Este perfil de citoquinas decidirá qué tipo de respuesta inmune adaptativa se pondrá en marcha, con la consecuente producción de diferentes subtipos efectores de linfocitos T, que serán adecuados para combatir diferentes tipos de infecciones (22).

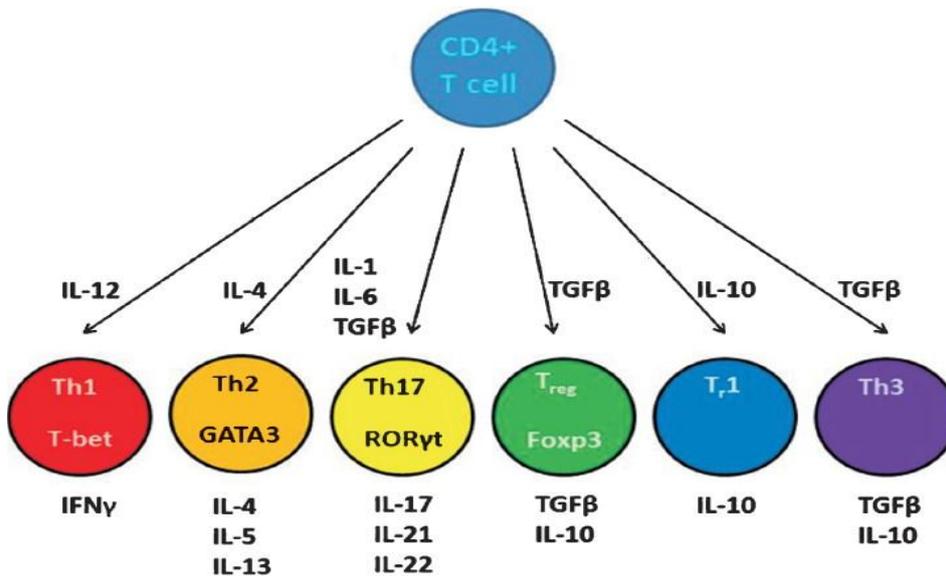


Figura 1.5. Diferenciación de linfocitos T hacia diferentes subtipos efectores. A partir de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes se generan diferentes subtipos de linfocitos T efectores, según el perfil de citoquinas producido por la DC. Extraído de www.ijmr.org.in/showBackIssue.asp?issn=0971-5916;year=2013;volume=138;issue=5;month=November.

Inmunomodulación por parásitos helmintos

Los parásitos helmintos co-evolucionaron con el sistema inmune de los vertebrados. Esto les permitió desarrollar estrategias para sobrevivir dentro del hospedero (33). De hecho, las infecciones por estos parásitos representan un gran desafío para el sistema inmune, principalmente debido a dos aspectos. El primero refiere al tamaño físico de estos parásitos, que hace imposible que puedan ser eliminados simplemente mediante un proceso de fagocitosis. Segundo, los helmintos tienen la capacidad de producir moléculas inmunomoduladoras que son directamente supresoras o confieren a algunas células de la inmunidad innata y adaptativa una función reguladora (34), favoreciendo la supervivencia del parásito.

Los helmintos son considerados como el patógeno paradigmático en generar una respuesta de tipo Th2, a partir de la producción de IL-4 (34). Esta respuesta de tipo Th2, en el caso de la gran mayoría de los helmintos, es en realidad una respuesta de tipo Th2 “modificada”, que se acompaña de la producción de IL-10 y TGF- β , además de la producción de IL-5 e IL-13 que son citoquinas clásicas de la respuesta de tipo Th2. La misma también suprime las respuestas inflamatorias, generando una mayor susceptibilidad a que el hospedero contraiga infecciones que se combaten con una respuesta tipo Th1 (38). En este sentido, se vio que la infección por

F. hepatica se encuentra asociada con un aumento de la susceptibilidad en las infecciones por *Salmonella dublin* o *Bordetella pertussis*. Además, se reportó que la fasciolosis reduce la capacidad predictiva de un test para la tuberculosis bovina que se basa en la producción de IFN- γ (39,40).

Los linfocitos Th2 producen una respuesta inmune anti-helmíntica no efectiva a través de la producción de citoquinas características nombradas anteriormente, que dirigen y activan otro tipo de células. La IL-4 se une tanto al receptor de IL-4 como al de la IL-13 resultando en la activación del factor de transcripción STAT-6. La IL-4 lleva al cambio de isotipo en los linfocitos B, resultando en la producción de inmunoglobulinas IgG1 específicas para el parásito e IgE. Algunas células como los basófilos, mastocitos y eosinófilos expresan el receptor para IgE (Fc ϵ R), y son activados cuando se unen a este isotipo de anticuerpo. Esta activación provoca la expulsión del contenido de los gránulos de estas células, los cuales poseen sustancias que son capaces de degradar la pared tisular del parásito (41).

La IL-4 y también la IL-13 promueven la activación alternativa de los macrófagos, generando macrófagos M2. Los mismos son muy importantes en una infección por helmintos ya que secretan una gran cantidad de compuestos anti-helmínticos que disminuyen la sobrevivencia del parásito (42). Otra función a destacar de los macrófagos M2 es la reparación tisular que llevan a cabo debido al daño producido por el parásito al migrar.

Los helmintos, o los productos que ellos producen, pueden interferir con el proceso de presentación de antígeno a los linfocitos T por parte de las DCs, confiriéndoles un fenotipo y/o funciones anérgicas o tolerogénicas. Esto puede prevenir el desarrollo de respuestas tipo Th1, Th17 inflamatorias o también Th2 inflamatorias (por ejemplo en el caso de las alergias) (36). En efecto, se ha demostrado que tanto DCs humanas como de ratón cultivadas con el antígeno soluble de huevos del parásito helminto *Schistosoma mansoni* adquieren un fenotipo semi-maduro, asociado a una menor expresión de marcadores de maduración y a la inducción de respuestas de tipo Th2 (37). Por otro lado, se evidenció que la molécula Lysophosphatidylserina de *S. mansoni* interacciona con las DCs vía TLR2 y promueve la diferenciación hacia linfocitos Treg productores de IL-10 (44). En el caso específico de *F. hepatica*, se vio que las DCs que maduran en presencia de los productos de excreción/secreción de este parásito adquieren un fenotipo semi-maduro que promueve la diferenciación de las células T hacia un fenotipo Th2/Treg (43).

Asimismo, un modelo de infección helmíntica con el parásito *Heligmosomoides polygyrus* demostró que la infección por dicho parásito expande un fenotipo inusual de DCs, que son las CD11c^{low} CD103⁻, que llevan preferentemente a la inducción de Treg a partir de linfocitos T naive, mientras que hay una reducción de DCs CD8 α ⁺ que son las que se ocupan de viajar entre el epitelio y las mucosas a los nódulos linfáticos secundarios, presentando antígenos y promoviendo las respuestas inmunes (42).

La capacidad de inducir respuestas Th2/Treg por parte de los helmintos ha quedado bien evidenciada por diferentes estudios que demostraron que la infección por algunos parásitos helmintos reduce los síntomas de muchas enfermedades autoinmunes y alergias en modelos animales (45). Una de las primeras evidencias experimentales fue reportada en ratas infectadas con el parásito *Symphacia obvelata*, el cual mejora los síntomas de artritis inducida

por el adyuvante de Freund (46). También se ha visto que la infección por *S. mansoni* disminuye los síntomas de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), un modelo murino de esclerosis múltiple humana (47). En el caso particular de *F. hepatica*, estudios recientes demostraron que la infección por este parásito también disminuye los síntomas de la EAE, mediante un mecanismo TGF- β dependiente (48). Otros estudios informan que la IL-33 también juega un papel importante a la hora de disminuir los síntomas de las enfermedades autoinmunes (49).

En resumen, la infección por parásitos helmintos produce una respuesta inmune de tipo Th2 modificada, determinada por la inducción de DCs con un fenotipo semi-maduro o tolerogénico. Las mismas llevan a la producción de linfocitos Th2 y Tregs, que producen moléculas que inhiben el desarrollo de respuestas tipo Th1 y Th17. Como consecuencia, las infecciones por este tipo de parásitos podrían disminuir los síntomas de alergias y enfermedades autoinmunes, pero al mismo tiempo aumentar la susceptibilidad a infecciones por bacterias intracelulares y otros patógenos que requieren respuestas inmunes de tipo Th1.

Expresión de marcadores en la DC durante la infección por *F. hepatica*

Como se informó en la sección anterior, las DCs sufren un proceso de inmunomodulación frente a la infección por *F. hepatica*, que se ve reflejado entre otras cosas por una disminución en marcadores de activación como CD80, CD86 y MHCII y en la producción de citoquinas como IL-10 y TGF- β (38). Además, el efecto inmunomodulador sobre las DCs ha sido informado en varios trabajos, los cuales mostraron que componentes de *F. hepatica* pueden modular la maduración de DCs y su función *in vitro* (42, 54).

Estudios previos de nuestro laboratorio realizados por Rodríguez *et al* se enfocaron en estudiar de una forma más exhaustiva la inmunomodulación de las DCs por *F. hepatica*. Las mismas fueron estudiadas *in vivo* durante la infección parasitaria tanto en bazo como en cavidad peritoneal de animales infectados. En primer lugar, se observó que luego de la infección se produjo un reclutamiento de células en el bazo y en la cavidad peritoneal de los animales infectados, que aumentaba a lo largo del tiempo. Dentro de los esplenocitos y células del PEC totales que se reclutaron, se vio que las DCs (que en este trabajo fueron definidas como CD11c^{hi}/F4/80⁻) también aumentaban a lo largo del tiempo (55).

En lo que refiere a la expresión de la molécula de MHCII, en el trabajo publicado por Rodríguez *et al* pudo constatarse mediante la técnica de citometría de flujo que, a pesar de que todas las DCs expresaban MHCII, dicha expresión se encontraba disminuida. De hecho, esta disminución fue bastante marcada en las DCs esplénicas, observándose un 50% menos en la expresión de MHCII de superficie desde la primera semana de infección. Además de la disminución en MHCII, también se vio reducida la expresión de CD40. La disminución en la expresión de MHCII tanto en las DCs del bazo como del peritoneo iba acompañada de un aumento de DCs productoras de IL-10 tanto en el bazo como en la cavidad peritoneal (55).

En cuanto a los macrófagos, definidos como células F4/80⁺ CD11c⁻ se vio que también eran reclutados en el bazo y en el peritoneo tras la infección, pero a diferencia de las DCs, la

expresión de MHCII no se vio reducida sino que, en el caso de los macrófagos del peritoneo, dicha expresión aumentaba. También se vio aumentada la cantidad de macrófagos productores de IL-10 tanto en el bazo como en la cavidad peritoneal (55).

En la presente tesina se buscó, por una parte, profundizar en los mecanismos moleculares que pueden explicar esta significativa disminución de la expresión de MHCII membranario. Por otro lado, también desarrollamos la técnica de evaluación de DCs por microscopía, a modo de completar la caracterización realizada en nuestro laboratorio. A continuación, se detallan aspectos relevantes a estos objetivos.

MHCII y moléculas asociadas con su síntesis, endocitosis, expresión y degradación

Los antecedentes antes mencionados acerca de la disminución en la expresión de la molécula de MHCII en las DCs de animales infectados con *F. hepatica*, abre la posibilidad de pensar en la siguiente pregunta: ¿Cuál es el mecanismo por el cual disminuye la expresión membranaria de MHCII en las DCs? ¿La molécula de MHCII es degradada o directamente disminuye su transcripción a nivel del genoma? También existe la hipótesis de que el MHCII disminuya en los animales infectados por un mecanismo de endocitosis, el cual podría encontrarse aumentado en las DCs.

Para responder estas preguntas primero es necesario realizar una revisión acerca de la molécula de MHCII en sí misma, así como de los factores de transcripción que regulan su expresión y las moléculas que están encargadas de su degradación en las DCs.

Las moléculas del MHCII son una familia de receptores celulares de superficie. Cada molécula es un heterodímero compuesto por dos cadenas, α y β . Cada cadena posee dos dominios, siendo los que se encuentran más cerca de la membrana plasmática los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ y los que se encuentran más lejos de la membrana los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$. A su vez, estos dominios forman lo que se conoce como la hendidura de unión al péptido, y es el sitio donde se encuentra la mayor variabilidad aminoacídica permitiendo que la molécula pueda unirse a una gran variedad de péptidos derivados de patógenos (20).

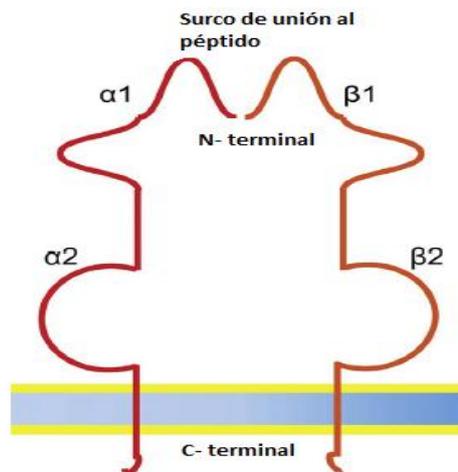


Figura 1.6. Estructura de la molécula de MHCII. Se muestran las cadenas α y β con sus dos dominios correspondientes. También puede observarse el surco de unión al péptido, formada por los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$. Extraído y modificado de (56).

Generalmente son expresadas sólo por APCs, como DCs, macrófagos y linfocitos B. La expresión constitutiva del MHCII está restringida a estos tipos celulares y su expresión membranaria puede ser inducida luego de la exposición a ciertas citoquinas como IFN- γ , siendo esta última la más potente en incrementar la expresión génica de MHCII (56).

La molécula del MHCII juega un rol central en el desarrollo de la inmunidad adaptativa ya que los péptidos inmunodominantes procedentes de antígenos son presentados a linfocitos T que expresan la molécula CD4. Las cadenas α y β se ensamblan en el retículo endoplásmico (RE) junto con una cadena invariable (I) formando complejos, los cuales salen del RE y siguen la vía secretoria del Golgi. El sistema endosomal-lisosomal se funde con el Golgi y la cadena invariable es degradada dejando un pequeño fragmento, CLIP. El mismo se intercambia con el péptido antigénico. Cuando se tiene el complejo completo MHCII-péptido, es expresado de forma estable en la membrana celular (57).

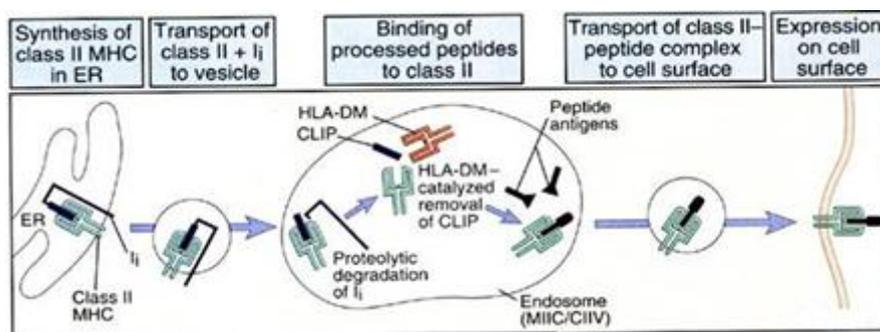


Figura 1.7. Vía de presentación antigénica. La molécula de MHCII se sintetiza en el RE, y luego es transportada mediante vesículas al compartimento endosomal, donde se une con los péptidos procesados derivados de patógenos. Finalmente, el complejo MHCII-péptido es expresado en la membrana celular. Extraído de (20).

La expresión tanto constitutiva como inducible de MHCII se encuentra regulada a nivel transcripcional por el factor de transcripción transactivador del complejo mayor de

histocompatibilidad de clase II (CIITA) (56). CIITA también regula la expresión génica de MHCII. Aunque esta molécula fue primariamente caracterizada como un regulador transcripcional de los genes de MHC, también regula la transcripción de más de 60 genes inmunológicamente importantes, como la IL-4 o la IL-10 (61). Todos los genes relacionados al MHCII poseen un motivo promotor conservado S-Y [54]. Se vio que defectos en CIITA llevan a una inmunodeficiencia fatal (59). CIITA no se une directamente al ADN, sino que ejerce un efecto transactivador a través de interacciones proteína-proteína con otros factores transcripcionales que sí se unen directamente al promotor S-Y (56). Existen evidencias que indican que CIITA es un factor importante para permitir la apertura de la cromatina en el sitio de los promotores del MHCII y lo hace mediante efectos directos sobre la estructura de la cromatina o reclutando factores remodeladores (60).

Se han realizado estudios *in vitro* que indican que el factor de transcripción CIITA podría jugar un rol importante a la hora de disminuir la expresión del MHCII en otras infecciones, tanto por parásitos como por bacterias y virus. Por ejemplo, se vio que en una infección *in vitro* de células THP-1 y monocitos humanos con la bacteria *Brucella abortus*, los niveles de MHCII disminuían. Cuando se investigaron las causas de esta disminución, se observó que la misma era dependiente de IL-6. Esta citoquina provoca una reducción en la transcripción de CIITA, lo que a su vez genera una disminución tanto en los niveles de ARNm como en los de proteína de MHCII (62). Otros estudios demostraron que la molécula Rv1016c que se encuentra asociada a la pared de *Mycobacterium tuberculosis* inhibe la expresión de CIITA, lo cual disminuye la expresión de MHCII (63).

La disminución en la expresión del MHCII también se observó en infecciones virales. En ese caso, se pudo determinar que la infección por citomegalovirus murino en macrófagos resulta en una disminución de la expresión de moléculas del MHCII en la superficie de la célula. Esta disminución es mediada por la producción de IL-10. Esta citoquina afecta la exocitosis y el reciclado de proteínas, generando así dicha reducción de MHCII (64).

Uno de los mecanismos descubiertos mediante el cual puede disminuir la expresión de MHCII en la superficie celular es la ubiquitinación. Por ejemplo, en el trabajo publicado por van Niel *et al* se reportó que, en las DCs inmaduras, la cadena β del MHCII es oligoubiquitinada luego de la degradación de la cadena invariable J en los lisosomas. Parece ser que esta señal de ubiquitinación dirige al MHCII al proteasoma para su degradación impidiendo que dicha molécula se exprese en la membrana. La ubiquitinación se encuentra inhibida en las DCs maduras, permitiendo que el MHCII se exprese en la membrana normalmente y presente los péptidos antigénicos a los linfocitos T. También se vio que la ubiquitinación es fundamental para la endocitosis del MHCII en las DCs inmaduras (65).

La ubiquitinación es llevada a cabo por una serie de moléculas denominadas MARCH (Membrane-Associated Ringfinger CH). En la DC, la principal es MARCH1. Dicha molécula es una E3 ubiquitina ligasa que lleva a cabo no solo la ubiquitinación del MHCII sino también de CD86 en DCs. Esta ubiquitinación, como se mencionó anteriormente, promueve la endocitosis, transporte lisosomal y degradación (66 – 69). La función de MARCH1 ha sido estudiada fundamentalmente en modelos de DCs *in vitro*. Se vio que cuando las DCs se exponen a un estímulo de maduración, la expresión de MARCH1 se inhibe (67). Esto lleva a un aumento en la

membrana de MHCII y CD86. Por otra parte, cuando las DCs se exponen a una citoquina como IL-10, la expresión de MARCH1 aumenta, disminuyendo la de MHCII (68).

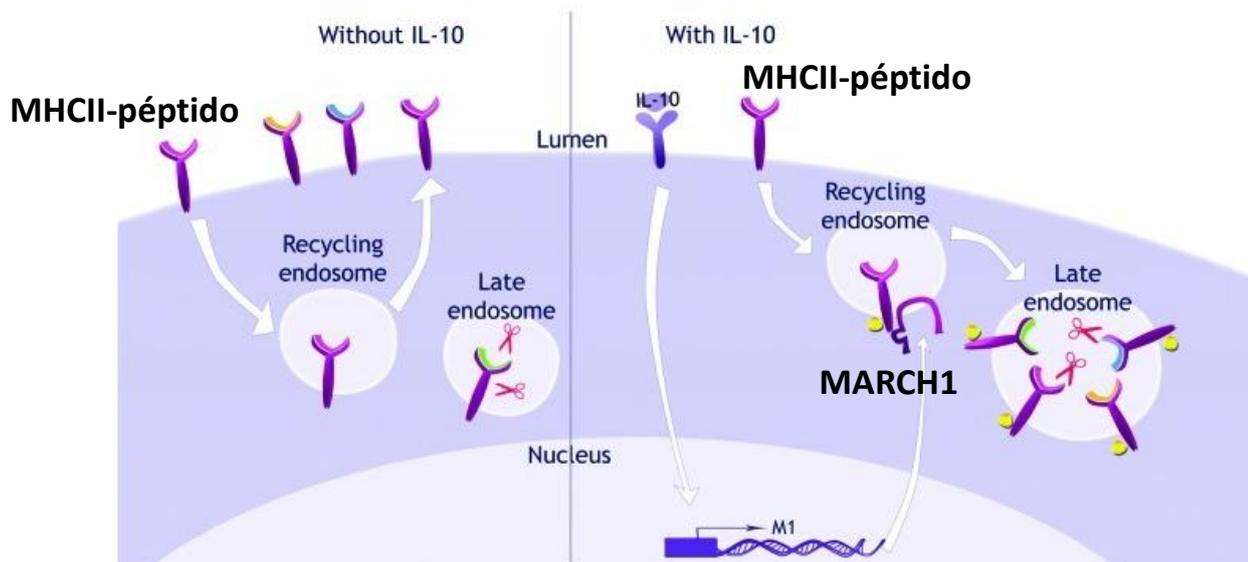


Figura 1.8. Vía de reciclado y degradación del complejo MHCII-péptido por MARCH1. Cuando IL-10 no está presente, el complejo MHCII-péptido se endocita para luego reciclarse nuevamente a la membrana plasmática. En presencia de IL-10, la misma se une a su receptor en la superficie celular y activa la transcripción del gen de MARCH1. Dicha molécula se une a la membrana de los endosomas y agrega residuos de ubiquitina al complejo MHCII-péptido, el cual se dirige al lisosoma donde es degradado por proteasas. Extraído de *Oncoimmunology* 1(6):908-916 · September 2012

En la presente tesis se profundizó en los mecanismos moleculares por los cuales *F. hepatica* conduce a la disminución en la expresión de MHCII de superficie por las DCs. Para ello, se evaluó la expresión génica por real-time PCR de MHCII, MHCI, CIITA y MARCH1 en DCs de animales infectados y se comparó con la expresión en animales naive no infectados. Se podría hipotetizar que los menores niveles de MHCII en la superficie de las DCs están relacionados con: i) Un nivel de expresión menor en los animales infectados que en los naive. ii) Una menor expresión de CIITA en DC de animales infectados; o iii) altos niveles de expresión y/o actividad de MARCH1 en DCs de animales infectados que podría promover la degradación de MHCII. Además del estudio mediante real time PCR, se realizó un abordaje del estudio de la endocitosis del MHCII, lo cual podría explicar también una disminución del MHCII de superficie. Con este fin se analizó por microscopía la endocitosis llevada a cabo por DCs provenientes de animales infectados y se las comparó con los animales naive.

MGL

Durante el transcurso de la caracterización del fenotipo y función de las DCs de animales infectados con *F. hepatica*, nuestro grupo de investigación identificó que las mismas expresan altos niveles de MGL, del inglés Macrophage Gal/GalNAc lectin (76). La molécula MGL es un receptor tipo lectina C que reconoce específicamente la terminal glucídica de las proteínas Gal/GalNAc. Se expresa tanto en DCs como en macrófagos y participa en el reconocimiento de

estructuras presentes en patógenos. Una vez reconocidas, este receptor puede modular la función de la APC haciendo que esta produzca cierto tipo de citoquinas, que determinará el tipo de respuesta adaptativa (70), a través de la modulación de la DC.

En humanos existe una sola variedad de MGL (hMGL) pero en ratón existen dos isoformas, mMGL1 y mMGL2. Las mismas poseen diferencias de especificidad en su ligando. Mientras que mMGL1 reconoce GalNAc en estructuras complejas como los antígenos Lewis^x y Lewis^a, mMGL2 reconoce GalNAc en estructuras más simples como el antígeno Tn (GalNAc-Ser/Thr) o el antígeno TF (Gal-GalNAc-Ser/Thr). Esta última isoforma de MGL es la que posee una especificidad similar al MGL humano (71).

Se ha reportado en varios estudios que MGL estaría involucrado en procesos de inmunomodulación interaccionando con residuos glucídicos de los patógenos (65). Algunos de estos reportes indican que MGL posee efectos reguladores de la respuesta inmune, potenciando la activación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺. También se vio que influye en la maduración de las DCs, haciendo que estas produzcan determinadas citoquinas reguladoras (72).

Un ejemplo mediante el cual puede evidenciarse el efecto inmunomodulador de MGL sobre las DCs lo constituye la interacción entre el MGL y el antígeno Tn. El mismo es expresado sobre la molécula de membrana CD45 en células T efectoras humanas. La activación de las células T humanas se acompaña de un cambio en la glicosilación. Esto lleva a la expresión del antígeno Tn, el cual es reconocido por MGL (73). Esta interacción MGL-Tn en células T efectoras conduce a una disminución de su actividad fosfatasa, lo que lleva a una disminución en la proliferación y eventualmente a la apoptosis de las células T (73).

Haciendo énfasis en la característica inmunomoduladora de MGL nombrada anteriormente, se observó que MGL podría estar involucrado en la retención de DCs inmaduras, ya que al bloquear MGL con un anticuerpo específico, la migración de DCs mejoró (74). Además, se vio que las DCs MGL⁺ condicionadas con ligandos de dicho receptor, adoptan un fenotipo tolerogénico que dirige la diferenciación de células T a linfocitos supresores Tr1 productores de IL-10, de forma MGL-dependiente (75).

En trabajos realizados en nuestro laboratorio, se observó que el MGL humano reconoce el antígeno Tn que está presente en el extracto total de *F. hepatica*. Además, se vio que las células CD11c⁺ MGL2⁺ producen una alta cantidad de citoquinas reguladoras como IL-10, TNF- α y TGF- β , sugiriendo un potencial rol regulador de estas células durante la infección (76).

Con el fin de obtener más información acerca de la infección por *F. hepatica* y con los antecedentes mencionados anteriormente, en la presente tesina se llevó a cabo la identificación mediante microscopía de células CD11c⁺ MGL2⁺ tanto en hígado como en células de la cavidad peritoneal de ratones infectados y no infectados (naive). Además, también se buscó la presencia de células F4/80⁺ MGL2⁺.

Objetivo General

El objetivo general de esta tesina fue continuar con la caracterización de las células CD11c⁺ en la infección por *F. hepatica* en ratones, basándonos en los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación. Con este fin, se estudiaron células CD11c⁺ a dos niveles:

- i) Expresión de MGL2, a través de la evaluación de la presencia de células CD11c⁺ MGL2⁺ y F4/80⁺ MGL2⁺ en el hígado de ratones infectados y naive, así como en el exudado de la cavidad peritoneal (PEC).
- ii) Mecanismos moleculares de la expresión disminuida de MHCII de superficie, a través del estudio de la expresión génica de las moléculas del MHC de DCs de animales infectados y naive, así como de algunas moléculas que tienen un papel en su regulación como CIITA y MARCH1.

Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de este trabajo fueron los siguientes:

- Conocer con mayor detalle las características histológicas del hígado murino durante la infección, como zonas necrosadas, presencia de infiltrados, zonas donde permanece tejido normal, etc.
- Identificar la presencia de células CD11c⁺ en el tejido hepático en animales infectados y correlacionarlo con la presencia de otros marcadores como MGL2 y F4/80.
- Identificar células MGL2⁺ en la cavidad peritoneal de animales infectados.
- Evaluar la expresión de la molécula de MHCII en células CD11c⁺ provenientes de la cavidad peritoneal de animales infectados mediante diferentes técnicas: qRT-PCR, citometría de flujo, microscopía.
- Evaluar la expresión génica de moléculas que pueden regular la expresión de MHCII, como CIITA y MARCH1, en células CD11c⁺ provenientes de la cavidad peritoneal de animales infectados.
- Analizar la endocitosis de MHCII en células CD11c⁺ provenientes de la cavidad peritoneal de animales infectados.

2. Materiales y Métodos

*Modelo murino de infección por *F. hepatica**

Para la realización de este trabajo se contaba con un modelo de infección murina por *F. hepatica* puesto a punto y caracterizado en nuestro laboratorio. En dicho modelo se utilizaron ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron adquiridos en la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Éstos fueron mantenidos en la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE - Facultad de Medicina), en un ambiente controlado, con temperatura entre 19 y 21°C y ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los animales fueron alojados en jaulas con filtro y recibieron agua y ración estéril, administradas en condiciones *ad libitum*. Todos los experimentos animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, UdelaR, Protocolos No. 071140-001822-11 y 071140-000143-12).

Grupos de 5 ratones BALB/c fueron infectados con 10 metacercarias de *F. hepatica*. Luego de 3 semanas de infección se obtuvieron las células del exudado peritoneal (PECs, de la sigla en inglés Peritoneal exudate cells), el bazo y el hígado.

Obtención de suspensiones celulares de PEC y bazo

Los PECs fueron obtenidos mediante lavado de la cavidad peritoneal con 5 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS) previamente enfriado, como ya ha sido descrito por nuestro grupo (55). En el caso de los PECs, se mantuvieron en hielo y luego se procedió a la purificación de células CD11c⁺ como se indica más adelante. Por otro lado, los hígados fueron congelados en Polyfreeze (Sigma).

Las células CD11c⁺ fueron purificadas a partir de PEC de animales infectados y naive. Como los animales naive poseen muy poca cantidad de células CD11c⁺ en la cavidad peritoneal, también purificamos a partir de bazo. Los bazos extraídos de animales naive se cortaron en pequeños trozos y se incubaron con 2,5 ml de medio de disociación (kit EasySep Mouse CD11c Positive Selection de StemCell Technologies) por 30 minutos a 37°C. Luego se agregó 50 µL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 M y se incubaron 5 minutos adicionales a 37°C. Pasado este tiempo los trozos de bazo se disgregaron mecánicamente y fueron transferidos a un tubo. Con el objetivo de lisar los glóbulos rojos, las células fueron incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente con 1 ml de buffer de lisis que contiene 8,3 g/L de cloruro de amonio en 0,01 M de buffer Tris-HCl pH 7,5 (Sigma). Luego las mismas fueron lavadas con 10 ml de PBS y centrifugadas a 300 x *g* por 10 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, se realizaron dos lavados adicionales con PBS. Por otro lado, los PECs extraídos fueron centrifugados a 300 x *g* por 10 minutos y lavados dos veces con PBS. Finalmente, ambas suspensiones celulares fueron resuspendidas en 1 ml de PBS. Para determinar la concentración celular, las células fueron contadas al microscopio utilizando un hemocitómetro. Se contaron solamente las células viables mediante el método de exclusión con Trypan blue.

Purificación de células CD11c⁺

Las células CD11c⁺ fueron purificadas a partir de PECs y bazos utilizando el kit de purificación EasySep Mouse CD11c Positive Selection de StemCell Technologies. Las células obtenidas provenientes de suspensiones celulares de PEC y bazo fueron resuspendidas en PBS conteniendo suero fetal bovino al 2% y 1 mM de EDTA (medio recomendado, MR), a una concentración de 1×10^8 cél/ml. Esta suspensión celular se transfirió luego a tubos de purificación. Posteriormente, se agregó suero de rata a 50 μ L/ml de células, según recomendaciones del proveedor. Luego se preparó un cocktail de purificación con 25 μ L/ml del reactivo A y 25 μ L/ml del reactivo B. Se dejó reposar este cocktail durante 5 minutos y seguidamente se lo agregó a la suspensión celular, incubándolo 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se incubó con las partículas magnéticas a 50 μ L/ml durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó la cantidad necesaria de MR para llegar a 2,5 ml y se colocó el tubo sin tapa en el imán durante 5 minutos. Luego se descartó el líquido sin dejar caer la última gota. Se repitió este procedimiento 3 veces más. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 1 ml de MR y contadas por medio de un hemocitómetro. La purificación resultó en todos los casos ser mayor al 90% de pureza evaluado por citometría de flujo. En el caso de análisis por qRT-PCR se las resuspendió en 100 μ L de Trizol o Tri-reagent.

Congelamiento de hígados

Los hígados de los ratones BALB/c fueron obtenidos luego de 3 semanas de infección con 5 metacercarias y mantenidos en PBS. También se obtuvieron hígados de animales sin infectar (control). Posteriormente, fueron colocados en canastas de aluminio, donde se les agregó PolyFreeze (Sigma) hasta cubrir por completo el hígado. Finalmente fueron sumergidos en nitrógeno líquido a -196 °C. Una vez que se formó el bloque congelado, los mismos fueron mantenidos a -80°C hasta su utilización.

Obtención de cortes histológicos de hígado para inmunofluorescencia

Los cortes histológicos de hígado se obtuvieron utilizando un crióstato Leica CM 1850 UV. Su espesor fue de 8 μ m. Para tomar los cortes se utilizaron láminas silanizadas.

Análisis por microscopía

Con el fin de identificar las células CD11c⁺ en el hígado de animales infectados con *F. hepatica*, se realizaron estudios de inmunofluorescencia por microscopía utilizando cortes de hígados de 8 μ m que fueron obtenidos como se indicó previamente. También se realizaron las mismas tinciones en hígados control sin infectar. Los cortes fueron fijados con acetona a -20 °C por 10 minutos. Luego se realizó un lavado de unos pocos segundos y se continuó con 3 lavados de 5 minutos. Todos los lavados se realizaron con PBS. Seguidamente se bloqueó el tejido previo a colocar los anticuerpos. Dicho bloqueo fue realizado con una solución de BSA (Seroalbúmina

bovina) al 5% más suero de rata al 3%, por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos.

Los anticuerpos utilizados fueron de la marca Biolegend (CA, USA). A continuación, se indican los anticuerpos utilizados en esta sección:

Tabla 2.1: Anticuerpos específicos contra moléculas murinas utilizadas en el análisis por microscopía.

Especificidad	Clon	Marcación	Concentración utilizada
CD11c	N418	APC	3,3 µg/ml
mMGL2	1468	PE	0,8 µg/ml
F4/80	BM8	APC	1 µg/ml

Los anticuerpos se incubaron toda la noche a 4°C en las concentraciones indicadas en la tabla 2.1. Las diluciones se realizaron en PBS conteniendo BSA al 0,5% y Azida de Sodio al 0,01%. Luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS. Para poder visualizar los núcleos, se llevó a cabo una contra-tinción con 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) a 5,7 µM incubando los tejidos por 5 minutos. Finalmente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS.

Previo a la búsqueda de una marca específica de los anticuerpos detallados en la tabla 3, se evaluó el daño hepático que presentaban los hígados de los animales infectados en comparación con los hígados de animales control o naive y se caracterizó la autofluorescencia que poseían ambos hígados. Para ello se realizaron los mismos pasos de fijación y bloqueo, pero no se agregaron anticuerpos. En su lugar, se incubaron con PBS conteniendo BSA 0,5% y Azida de Sodio al 0,01% durante toda la noche a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS. Posteriormente se realizó una tinción con DAPI como se describió anteriormente.

Finalmente, los cortes fueron montados en medio oleoso utilizando Fluoromount (Sigma) y mirados inmediatamente con microscopios de epifluorescencia Olympus IX81 y/o confocal Leica SP5. Para las tinciones de las células del líquido peritoneal, se realizó un procedimiento similar al descrito para los hígados.

Extracción de ARN, cuantificación y medida de pureza

El ARN de las células CD11c⁺ purificadas tanto de PECs como de bazo fue obtenido de las células almacenadas en Tri-reagent o Trizol. En primer lugar, se resuspendieron las células en 500 µL del reactivo Tri-Reagent y se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 125 µL de cloroformo, se vortexeó por 15 segundos y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de la incubación se obtuvieron dos fases. La fase superior o acuosa se pasó a otro eppendorf y se agregó 500 µL de isopropanol por cada mL de Tri-Reagent utilizado. Se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por

10 minutos a 12000 x g a 4°C. El *pellet* obtenido corresponde al ARN. El mismo se lavó con 1 ml de etanol 75% (preparado con H₂O-DEPC). Se vortexeó y se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Se dejó secar el *pellet* aunque no totalmente. Se resuspendió en 30 µL de H₂O-DEPC previamente calentada a 55°C.

Luego de la extracción, fue necesario cuantificar el ARN. Dicha cuantificación se realizó por espectroscopía, a través de la medida de la absorbancia a 260 nm. También se determinó la pureza del ARN extraído por medio de la relación entre la absorbancia a 260 nm (que representa la cantidad de ácidos nucleicos existentes) y la absorbancia a 280 nm (que representa la cantidad de proteínas). En el caso del ARN, esta relación debe ser mayor a 1,7. Las medidas de cuantificación y grado de pureza se realizaron en un equipo Nanodrop.

Síntesis de ADN copia (ADNc)

Para sintetizar el ADNc, se partió del ARN extraído previamente de las células CD11c⁺. En primer lugar se realizó una mezcla o *mix* de reacción para sintetizar ADNc, que incluye TransAmp *buffer* a una concentración de 5X, la enzima transcriptasa reversa a 200 U/µL y H₂O-DEPC hasta completar 20 µL (según recomendación del proveedor). Los volúmenes utilizados se multiplicaron por la cantidad de muestras que se tenían, y se le agregó una muestra adicional. Todos los reactivos presentes en la *mix* pertenecieron al kit Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline). Una vez preparada dicha *mix*, se dispensaron 8 µL de la misma en cada tubo. La cantidad de ARN que se agregó en cada tubo fue de 2 µg/muestra.

Luego, estos tubos se incubaron a 25°C por 10 minutos, seguido de una incubación a 45°C por 30 minutos. Por último, se realizó una incubación a 85°C por 5 minutos. El ADNc se almacenó a -20°C o se procedió a realizar la qRT-PCR.

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se realizó qRT-PCR para determinar la expresión génica de MHCII, MHCI, CIITA y MARCH1 en células CD11c⁺ de animales infectados y naive. Para ello se utilizaron primers específicos de dichos genes, los cuales se describen en la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Primers específicos utilizados en la presente tesina. Se detalla la secuencia y la T_m correspondiente utilizada.

Gen	Primer	Secuencia	T _m
MHCII	MHCII-F	5'GTG GAT CAC TGG GGC TTG 3'	56 °C
MHCII	MHCII-R	5'GAC CCA CAA ACA ACC CAA GA3'	56°C
MHCI	MHCI-F	5'CGC TGA GGT ATT TCG AGA CC3'	54°C
MHCI	MHCI-R	5'AAC TCC GTG TTG TCC ACG TA3'	54°C
CIITA	CIITA-F	5'ACG CTT TCT GGC TGG ATT AGT3'	56°C
CIITA	CIITA-R	5'TCA ACG CCA GTC TGA CGA AGG3'	56°C
MARCH1	MARCH1-F	5'ATG CAC GGA CAA AGC AAT GG3'	58°C
MARCH1	MARCH1-R	5'GTG TGA AGT CAC GGG CAA TC3'	58°C
GAPDH	GAPDH-F	5'CTG AGA ACG GGA AGC TTG TC3'	54°C,56°C,58°C
GAPDH	GAPDH-R	5'CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG3'	54°C,56°C,58°C

En primer lugar, se realizó la *mix* de PCR que contenía SensiFAST SYBR No-ROX a una concentración de 1X, 200 nM del primer forward, 200 nM del primer reverse, DMSO al 5% y la cantidad necesaria de agua para llegar a 20 µL (según recomendación del proveedor). Los volúmenes utilizados se multiplicaron por la cantidad de muestras que se tenían y se le agregó una muestra adicional. Todos los reactivos de la *mix* pertenecieron al kit SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline). Luego se dispensó 9 µL de la *mix* y se colocó 1 µL de ADNc por pocillo. Por cada juego de primers se realizó un control donde no se colocó ADNc. La qRT-PCR se realizó en un termociclador Eco Illumina. Previamente fue necesario poner a punto la T_m de los primers, resultando ser 56°C la T_m de los primers del MHCII y el CIITA, 58°C la T_m de MARCH1 y 54°C la T_m de MHCI. El análisis de datos se realizó con el programa EcoStudy y siempre se utilizó el gen constitutivo GAPDH para calcular la expresión relativa de los genes antes mencionados, mediante la ecuación:

$$\text{Expresión Relativa} = 2^{-\Delta Cq}, \text{ donde } \Delta Cq = Cq \text{ de GAPDH} - Cq \text{ del gen de interés}$$

Análisis por citometría de flujo

La evaluación de la expresión de las moléculas MHCII y CD11c por las células CD11c⁺ tanto de animales infectados como naive se llevó a cabo mediante la técnica de citometría de flujo. Para ello, se dispensaron 200.000 células CD11c⁺ por pocillo en una placa de 96 pocillos y se lavaron con 200 µL de buffer FACS (2% de suero fetal bovino en PBS y azida de sodio al 0,1%), centrifugando a 2000 rpm por 2 minutos.

Luego se realizó la tinción membranaria de las moléculas de MHCII y CD11c. Para esto se incubaron las células durante 30 minutos a 4°C con una *mix* de los anticuerpos anti-MHCII PE (clon M5/114.15.2) a una concentración de 0,1 µg/ml y anti-CD11c PE/Cy7 (clon N418) a una concentración de 0,6 µg/ml. Los anticuerpos utilizados fueron de la marca eBioscience y Biolegend respectivamente. También se incubaron células monomarcadas (controles) con cada uno de estos anticuerpos y células sin marcar. Posteriormente las células se lavaron dos veces con buffer FACS y se fijaron con 0,1% de formaldehído en PBS durante 15 minutos a 4°C. Por último, las células se lavaron dos veces más con buffer FACS y se resuspendieron con 400 µL de buffer FACS hasta su análisis, que se realizó con un citómetro de flujo Cyan (Beckman Coulter).

Ensayo de localización y endocitosis de la molécula de MHCII

Para evaluar el grado de endocitosis de MHCII por las células CD11c⁺, se incubaron 200.000 células CD11c⁺ por pocillo en una placa de 96 pocillos, junto con el anticuerpo anti-MHCII PE (clon M5/114.15.2) en una concentración de 1 µg/ml por 3 horas a 37°C. Luego se lavaron las células dos veces en buffer FACS, y se fijaron con formaldehído al 0,1% en PBS por 15 minutos a 4°C. Finalmente se volvieron a lavar las células dos veces con buffer FACS y se colocaron en láminas silanizadas, que fueron dejadas a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las láminas con PBS 3 veces por 5 minutos y se colocó DAPI a 5,7 µM. Posteriormente se lavaron nuevamente las láminas con PBS 3 veces por 5 minutos, se dejaron secar y se montaron con el reactivo Fluoroamount. Las láminas se analizaron con el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81.

3. Resultados

Como se explicó previamente, el objetivo de esta tesina consistió en profundizar en la caracterización de las células CD11c⁺ previamente identificadas en nuestro laboratorio. En este sentido, se plantearon dos preguntas que, si bien ambas colaboran en dicha caracterización, son muy diferentes y no pueden ser tratadas en conjunto. Por este motivo, tanto la sección resultados como la sección discusión se dividieron en dos partes, en las cuales se trataron estos dos objetivos separadamente. Las figuras se encuentran al final de la sección resultados.

Parte I: Caracterización por microscopía de células CD11c⁺ en hígado y cavidad peritoneal de animales infectados

Características del hígado murino durante la infección por F. hepatica

Previo a la identificación de células en el tejido hepático utilizando anticuerpos, resultó necesario conocer las características de este tejido durante la infección, sobre todo considerando que esta técnica aún no había sido abordada en el laboratorio. Para este fin, se realizaron tinciones de cortes de hígado murino de 8 µm de espesor tanto de animales infectados como naive y se tiñeron únicamente con el colorante DAPI para evidenciar los núcleos celulares. Se tuvo cuidado de seleccionar, dentro de los hígados infectados, aquellos que tuvieran diferente grado de daño. De esta manera, se comparó un hígado normal, otro con poco nivel de daño (+) y por último uno con un nivel de daño muy alto (+++), según la tabla que se muestra (Tabla 3.1). Dichos niveles de daño fueron adjudicados observando el hígado, luego de que el mismo fuera extraído de los ratones sacrificados.

Tabla 3.1: Grados de daño en los hígados infectados con *F. hepatica* y sus características.

Grado de daño hepático	Características
+	lesiones puntuales en uno de los lóbulos
++	lesiones puntuales en dos o más lóbulos
+++	lesiones en todo el hígado

En la figura 3.1 se observa el tejido hepático de ratón naive teñido únicamente con DAPI. Además, se realizaron aumentos de diferentes zonas de este tejido y se mostraron, además del DAPI, los canales PE y FITC sin ningún anticuerpo, para detectar una posible autofluorescencia. En la figura 3.1A es posible observar la estructura del hígado murino normal. En el tejido hepático uniforme pueden verse interrupciones que corresponden a los vasos sanguíneos que atraviesan el mismo. No se ven signos de tejido necrosado o dañado, ni tampoco grandes infiltrados leucocitarios. Es importante resaltar que evidenciamos algo de autofluorescencia a las longitudes de onda correspondientes al FITC y al PE (de ahora en más llamadas “canales de FITC y PE” respectivamente), ya que se aprecia algo de color en ambos canales.

Posteriormente, analizamos el tejido proveniente de hígados de ratón infectado con un daño severo (catalogado como +++ según tabla 3.1). En la figura 3.2A puede apreciarse claramente que existe un cambio en el tejido hepático debido a la infección por *F. hepatica*. Pueden apreciarse una gran cantidad de zonas necrosadas y grandes infiltrados leucocitarios (marcados con dos y uno, respectivamente). Las zonas de necrosis pudieron identificarse porque, al estar el tejido muerto también lo están las células y el DAPI no puede marcar los núcleos, viéndose como una gran zona oscura (Figura 3.2B2). Los infiltrados linfocitarios son distinguibles porque: i) al acumularse una gran cantidad de núcleos teñidos uno al lado del otro, se logra una tonalidad mucho más clara que en el tejido normal; ii) los núcleos de las células son más pequeños y se encuentran más amontonados; iii) en general se encuentran asociados a los vasos sanguíneos. En lo que refiere a las figuras 3.2C y 3.2D, se puede ver que el hígado infectado también presentó autofluorescencia. De hecho, la autofluorescencia de una zona de infiltrado es un poco mayor que la del hígado normal. Por último, al observar las figuras 3.2C2 y 3.2D2 correspondientes a la zona necrosada, puede verse que hay una gran autofluorescencia, ya que los colores se encuentran más brillantes e intensos. Esto podría deberse a que en dichas zonas necrosadas las fibras de colágeno del tejido se encuentren más expuestas. Las fibras de colágeno poseen autofluorescencia (77).

Al encontrar bastante autofluorescencia en los hígados con mayor daño, decidimos evaluar hígados con un menor daño hepático. Para ello, identificamos y analizamos como ya se describió para los otros hígados, tejido hepático de un ratón infectado con un daño leve (+). En la figura 3.3A puede verse que la disposición del tejido cambia con respecto al hígado normal, pero no presenta zonas necrosadas ni infiltrados leucocitarios tan grandes como los observados en el tejido con daño severo. En cambio, se evidencian infiltrados de pequeño a mediano tamaño alrededor de los vasos sanguíneos. Interesantemente, el nivel de autofluorescencia del hígado con daño leve fue comparable al del hígado normal (Figuras 3.3C y 3.3D).

En conjunto, estos resultados nos permitieron concluir que para teñir el tejido hepático con anticuerpos específicos, era necesario utilizar hígados que tuvieran un daño leve (+), y especialmente que no tuvieran zonas necrosadas. De esta manera, se logra minimizar la autofluorescencia natural que posee el tejido hepático dañado y evita confundir una señal específica con una señal de autofluorescencia.

Identificación de células CD11c⁺ MGL2⁺ y células F4/80⁺ MGL2⁺ en hígados de animales infectados

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han identificado a la molécula MGL como una de las principales en la interacción con estructuras parasitarias, y en particular se vio que interacciona con el antígeno Tn (76). Dado que el adulto de *F. hepatica* se aloja en el hígado, resulta interesante averiguar si en el tejido hepático de ratones infectados existen células CD11c⁺, y en particular si expresan el receptor MGL2, el cual podría interactuar con el antígeno Tn parasitario. Además se buscó la presencia de células F4/80⁺, para investigar si puede haber otro tipo celular que exprese MGL2 además de las células CD11c⁺. Es importante resaltar que, aunque tradicionalmente la molécula CD11c se utiliza como marcador de DCs, no

se encuentra exclusivamente en estas células. Además, como algunas DCs expresan bajos niveles de F4/80, el análisis de esta molécula resulta más completo a la hora de identificar las DCs.

Para este fin, diferentes cortes de hígado murino con daño leve (+) o controles (de animales naive), fueron incubados en una primera instancia con un anticuerpo específico de MGL2, siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.4. Se observó que el tejido hepático de animales infectados presentaba células MGL2⁺ como puede apreciarse en las figuras 3.4A y 3.4B. Las células MGL2⁺ se encontraban predominantemente en los infiltrados inflamatorios, y también alrededor de los vasos sanguíneos (Figura 3.4A). Por otro lado, la figura 3.4B muestra con un mayor aumento una zona del mismo tejido observado a 4X. En particular, dicha figura muestra un vaso sanguíneo rodeado de un infiltrado, donde pueden verse gran cantidad de células MGL2⁺. Por último, las figuras 3.4C y 3.4D muestran tejido hepático normal donde no se observan células MGL2⁺, sugiriendo que estas células están asociadas a la infección parasitaria.

Para profundizar en la caracterización de las células MGL2⁺, evaluamos si también eran células CD11c⁺, ya que podrían tratarse de DCs con propiedades inmunomoduladoras como ya se ha descrito [72]. La figura 3.5 muestra imágenes de inmunofluorescencia de tejido hepático de ratones infectados y naive tomadas con microscopio confocal. En dichas figuras es posible observar que en el hígado de animales infectados se da la presencia de células tanto MGL2⁺ como CD11c⁺. Además, algunas de ellas presentan ambos marcadores, por lo que se da una colocalización de ambos colores, percibiéndose de color amarillo en la figura. Es interesante destacar que, si bien existen células CD11c⁺, hay una mayor cantidad de células MGL2⁺. La figura 3.5D muestra la marcación con los mismos anticuerpos de un hígado de un animal naive, donde no se observan células CD11c⁺ MGL2⁺. Estos resultados indicarían que una de las características del hígado durante la infección es la presencia de células CD11c⁺ MGL2⁺, las cuales podrían ser reclutadas, ya que muchas de ellas se encuentran en infiltrados de leucocitos que llegan desde los vasos sanguíneos.

Por otro lado, también analizamos la presencia de células F4/80⁺. Como se observa en la figura 3.6, en el tejido hepático de animales infectados se evidenciaron células F4/80⁺ MGL2⁺. Al igual que cuando comparamos con la marcación de CD11c, el número de células MGL2⁺ es mayor al de células F4/80⁺. En algunas células pudo observarse la co-localización de las dos moléculas, lo que se evidencia en las imágenes por el color amarillo (Figura 3.6). Esto indicaría que, además de las DCs CD11c⁺, también otros tipos celulares como los macrófagos expresarían MGL, corroborando lo que ya está informado en la literatura (70). Como no se realizó una marcación de las moléculas MGL2, CD11c y F4/80 en simultáneo, podría darse el caso que se estén expresando estas tres moléculas en las células y que por lo tanto se trate de las mismas células identificadas como CD11c⁺ MGL2⁺. La figura 3.6D muestra un tejido hepático de un ratón naive marcado con los mismos anticuerpos, donde no se observan células MGL2⁺ ni F4/80⁺, indicando que las mismas son reclutadas durante la infección.

Identificación de células MGL2⁺ en PEC de animales infectados

Dado que nuestro grupo de investigación había previamente identificado la presencia de células MGL2⁺ en PECs de ratones infectados con la técnica de citometría de flujo (76), quisimos complementar dichos resultados a través de la identificación de estas células por otra técnica como ser la microscopía, siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos. Para ello, obtuvimos células de la cavidad peritoneal de animales infectados o naive (control) y procedimos a la marcación con el anticuerpo anti mMGL2. En la figura 3.7 se observan células MGL2⁺ en el PEC de ratones infectados, mientras que las mismas están ausentes en el PEC de animales naive. Además, se observa que la morfología de estas células de los animales naive es diferente a la de los infectados, y hay menor cantidad de células que en el PEC de estos últimos. Los resultados de este experimento indicarían que células MGL2⁺ estarían siendo reclutadas al peritoneo durante la infección por *F. hepatica*, respaldando lo observado previamente por citometría de flujo (76).

A modo de conclusiones generales de la parte I, puede afirmarse que:

- i) El tejido hepático de los animales infectados presenta ciertas características histológicas como presencia de infiltrados y zonas necrosadas.
- ii) Un alto grado de daño hepático (+++) se correlaciona con un alto nivel de autofluorescencia en el tejido, sobre todo en las zonas necrosadas, probablemente debido a la fibrosis.
- iii) Existen células MGL2⁺ en el PEC de animales infectados.
- iv) En el tejido hepático de animales infectados se identificaron células CD11c⁺. Algunas de ellas expresan además los marcadores MGL2 y F4/80. Estas células se encuentran sobre todo a nivel de los infiltrados leucocitarios y alrededor de los vasos sanguíneos.

Estos resultados indicarían que la infección por *F. hepatica* llevaría a un reclutamiento de células del sistema inmune como DCs (definidas como CD11c⁺) y macrófagos (definidas como F4/80⁺) al hígado, así como también a la cavidad peritoneal. Es importante destacar que los resultados obtenidos en esta sección de esta tesina formaron parte de un trabajo recientemente publicado (76).

Parte II: Evaluación preliminar de los mecanismos moleculares que conducen a la expresión disminuida de MHCII en células CD11c⁺ peritoneales de animales infectados.

Expresión de MHCII en células CD11c⁺ medida por citometría de flujo

En trabajos anteriores llevados a cabo por E. Rodríguez durante su tesis de doctorado se observó que la expresión de MHCII se encuentra disminuida en las células CD11c⁺ provenientes del peritoneo y de bazo de animales infectados, en comparación con la expresión en animales naive. Con el fin de corroborar estos resultados, se midió la expresión de MHCII mediante citometría de flujo a partir de células CD11c⁺ purificadas de PEC, tanto en animales infectados como naive.

En la figura 3.8A se muestra la estrategia de análisis que se utilizó para evaluar la expresión de MHCII en células CD11c⁺ provenientes del PEC de animales naive, en comparación con la expresión en animales infectados. En primer lugar, en R1 se seleccionaron las células viables según el tamaño y la granulocidad. Luego, a partir de R1, se retuvieron los eventos simples (singuletes) (R2). Posteriormente, en R3 se seleccionaron las células que resultaron ser CD11c⁺. En estas células, se analizó la intensidad de fluorescencia del MHCII, que se correlaciona con la intensidad de expresión de dicha molécula en estas células (ver histograma en figura 3.8A y 3.8B). De forma análoga, analizamos la intensidad de fluorescencia de MHCII en células CD11c⁺ purificadas de ratones infectados (Figura 3.8C). La cuantificación de la expresión de MHCII en células CD11c⁺ de ratones naive es mayor (más del doble) que la expresión por células CD11c⁺ de ratones infectados. Por último, en la figura 3.8D es posible apreciar el porcentaje de células CD11c⁺ en PEC de animales infectados y naive. Se evidencia que la cantidad de células CD11c⁺ en los animales infectados resultó ser mayor que la de los naive. Estos resultados confirman los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, los cuales reportan que la expresión de MHCII se encuentra disminuida en las células CD11c⁺ de animales infectados por *F. hepatica* (55).

Evaluación de la expresión génica de MHCII, MHCI y CIITA en células CD11c⁺ peritoneales

Como se explicó en la sección “introducción”, la expresión del gen tanto de MHCII como de MHCI está regulada por el factor de transcripción CIITA (57). Una disminución en la expresión génica de CIITA podría llevar a una disminución de la cantidad de ARNm de MHCII presente en la célula, lo que finalmente generaría una disminución en la producción de la proteína.

Con el fin de comprobar esta hipótesis, se realizó un estudio mediante qRT-PCR de la expresión génica de MHCII, CIITA y MHCI. Se extrajo el ARN de células CD11c⁺ purificadas tanto de animales infectados como naive para luego sintetizar ADNc. La expresión de cada gen siempre se midió relativa a la expresión del gen constitutivo GAPDH.

En la figura 3.10 se observan los gráficos obtenidos luego del procesamiento de datos. La figura 3.10A muestra una disminución en la expresión del MHCII en los animales infectados. En el caso de la figura 3.10B, también se observó una disminución significativa en la expresión del factor de transcripción CIITA. Para el caso de MHCI (Figura 3.10C) no se visualizaron diferencias significativas en la expresión.

Estos resultados parecerían indicar que la disminución en la expresión de MHCII en los animales infectados podría darse, al menos en parte, por una disminución en la expresión génica del factor de transcripción CIITA.

Evaluación de la expresión génica de MARCH1 en células CD11c⁺ peritoneales

Otro factor que podría influir en la disminución de la expresión de MHCII podría ser que, a pesar de que la proteína se produzca normalmente, mediante algún mecanismo se degrade y por lo tanto se exprese en menor medida. Se encuentra reportado que la degradación del MHCII está regulada por un mecanismo de oligoubiquitinación (65), y que dicha ubiquitinación es llevada a cabo por la ubiquitina ligasa MARCH1 (67). Por lo tanto, si hay un aumento en la expresión génica de MARCH1, podría llevar a una degradación elevada de la molécula MHCII, por lo que disminuiría su expresión.

Con el fin de corroborar esta hipótesis, se realizó el mismo procedimiento que para MHCII, MHCI y CIITA. Como se observa en la figura 3.10D, se vio que existe una tendencia a un aumento en la expresión génica de MARCH1 para los animales infectados, pero esta diferencia no fue significativa.

Análisis de la localización y endocitosis de MHCII por microscopía en células CD11c⁺ peritoneales

Como se mencionó en la sección anterior, se tenía el antecedente de que las células CD11c⁺ de animales infectados presentan menor expresión de MHCII en su superficie (50). Por otro lado, trabajos previos publicados indican que cuando la molécula de MHCII no puede ser correctamente ubiquitinada, la misma se expresa en mayor medida en la membrana plasmática. Por el contrario, cuando la molécula de MHCII es altamente ubiquitinada, se favorece su endocitosis (78).

Teniendo en cuenta esta información, nos planteamos la hipótesis de que la disminución en la expresión de MHCII se asocia a un aumento en la endocitosis del MHCII en las células CD11c⁺ peritoneales de los animales infectados. Con el fin de investigar esta hipótesis, se incubaron células CD11c⁺ purificadas con el anticuerpo anti-MHCII durante 3 horas a 37°C. Luego se observaron las células con microscopio de epifluorescencia. Como se ve en la figura 3.9, la marcación de MHCII en las células CD11c⁺ de ratones infectados fue citosólica, y se caracterizó por tener un patrón particulado. Esto podría indicar que la molécula de MHCII estaría siendo endocitada en vesículas, como por ejemplo endosomas o lisosomas. Por el contrario, en el caso de las células CD11c⁺ de animales naive, la localización de MHCII se detectó a nivel del

citoplasma y también a nivel de la membrana. Además, no se observó el patrón particulado observado para los animales infectados. Por lo tanto, podría decirse que la molécula de MHCII en células CD11c⁺ peritoneales de animales infectados estaría sufriendo una mayor endocitosis que en las células CD11c⁺ de animales naive.

En este trabajo también se realizó la maduración de células CD11c⁺ con un estímulo externo, como ser Pam3CSK4, para confirmar la expresión membranaria de MHCII. Se observó que cuando las células de animales naive o control eran maduras con este estímulo, la expresión de MHCII fue completamente membranaria (resultados no mostrados).

Estos resultados indicarían que las células CD11c⁺ peritoneales de animales infectados estarían realizando una mayor endocitosis de MHCII que las células CD11c⁺ de animales naive, y este podría ser uno de los motivos de la disminución en la expresión de MHCII membranaria en células CD11c⁺ de animales infectados.

A modo de conclusión general de la parte II, puede afirmarse que:

- i) La expresión de MHCII evaluada mediante citometría de flujo en células CD11c⁺ de animales infectados fue menor que para las células CD11c⁺ de animales naive.
- ii) Se determinó una mayor endocitosis de la molécula de MHCII en las células CD11c⁺ de los animales infectados, en comparación con los animales naive.
- iii) La expresión génica de MHCII y CIITA se vio disminuida en las células CD11c⁺ de los animales infectados en comparación con los animales naive, mientras que la expresión de MHCI y MARCH1 no se vio modificada.

Estos resultados indicarían que la disminución de la expresión de MHCII en los animales infectados podría darse debido a una disminución en la expresión génica de CIITA y/o a un aumento en la endocitosis de la proteína MHCII en células CD11c⁺ de animales infectados.

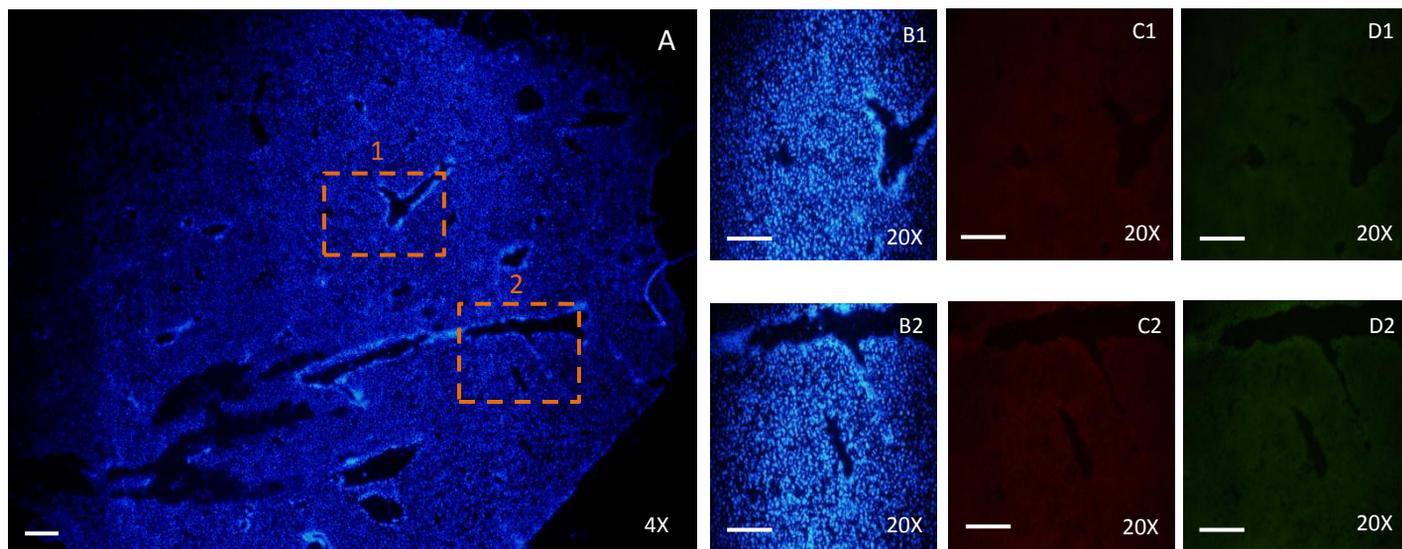


Figura 3.1. Evaluación por microscopía del tejido hepático normal. El tejido hepático de ratón no infectado se incubó con PBS conteniendo BSA 0,5% y azida de sodio 0,01%. Al día siguiente se tiñó con DAPI. **A)** Tejido hepático normal a menor aumento. **B)** Zonas 1 y 2 a mayor aumento con la tinción de DAPI. **C)** Fluorescencia detectada en el canal del PE para las zonas 1 y 2. **D)** Fluorescencia detectada en el canal del FITC para las zonas 1 y 2. La barra blanca representa 100 μm .

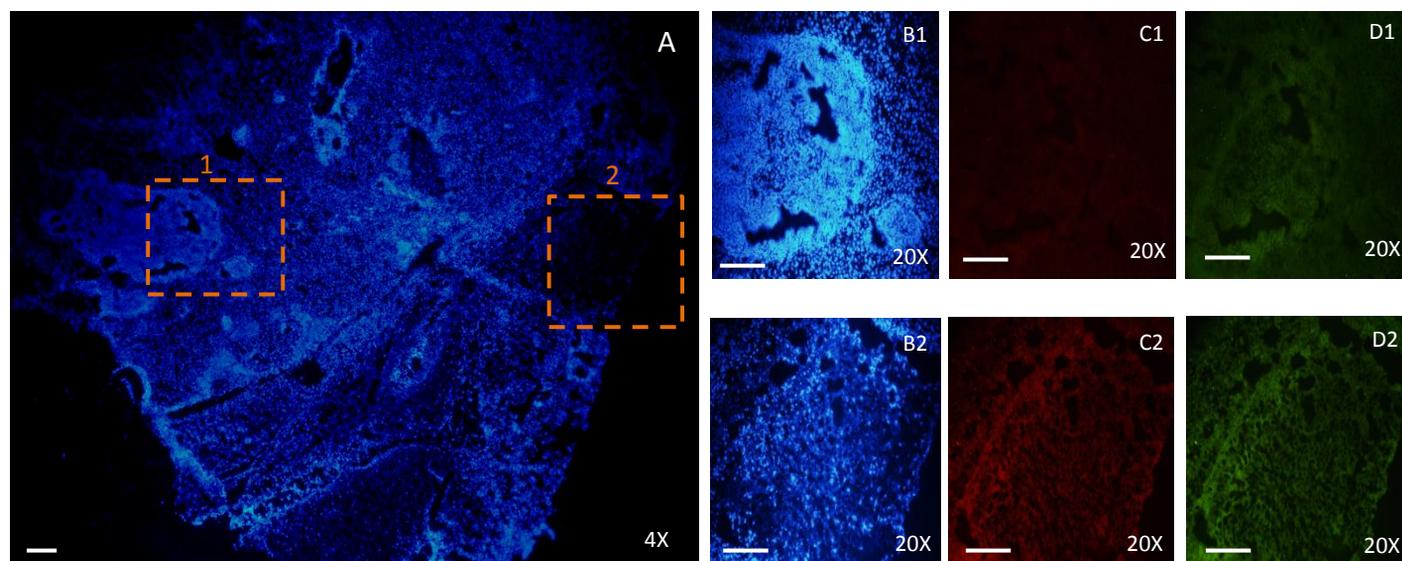


Figura 3.2. Evaluación de tejido hepático con daño severo durante la infección con *F. hepatica* mediante microscopía. El tejido hepático de ratón infectado con un daño severo (+++) se incubó en PBS conteniendo BSA 0,5% y azida de sodio 0,01%. Al día siguiente se tiñó con DAPI. **A)** Tejido hepático con daño severo a menor aumento. **B)** Zonas 1 y 2 a mayor aumento con la tinción de DAPI. **C)** Fluorescencia detectada en el canal del PE para las zonas 1 y 2. **D)** Fluorescencia detectada en el canal del FITC para las zonas 1 y 2. La zona 1 corresponde a un infiltrado leucocitario, mientras que la zona 2 corresponde a una zona con alta necrosis. La barra blanca representa 100 μm .

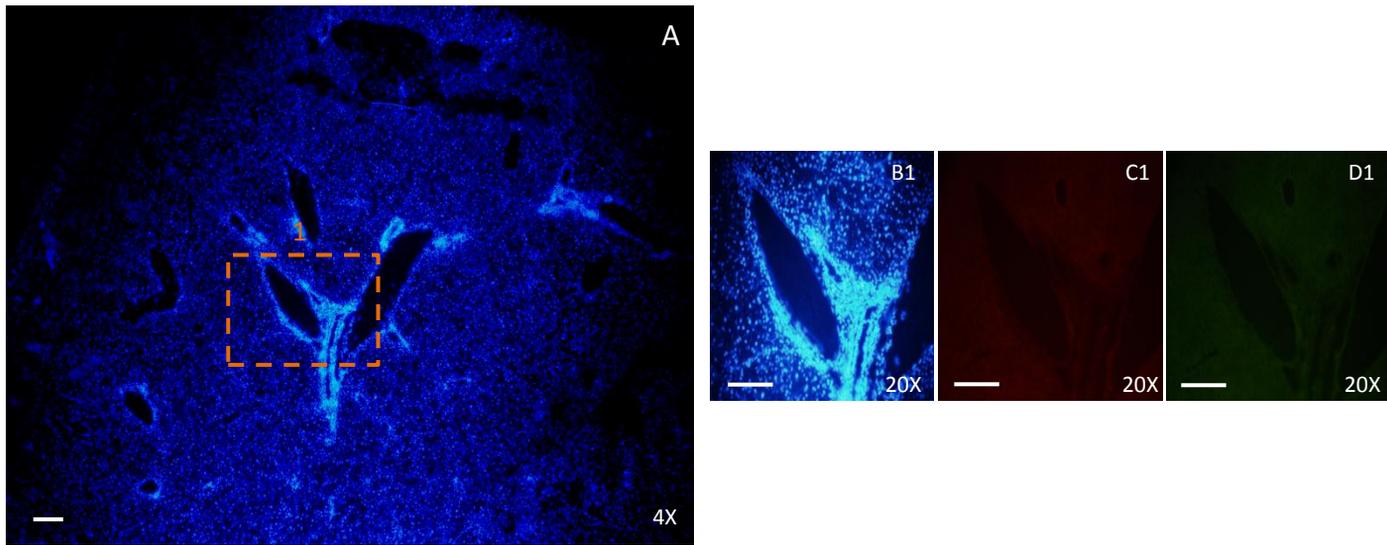


Figura 3.3. Evaluación del tejido hepático con daño leve durante la infección con *F. hepatica* mediante microscopía. El tejido hepático de ratón infectado con un daño leve (+) se incubó en PBS conteniendo BSA 0,5% y azida de sodio 0,01%. Al día siguiente se tñó con DAPI. A) Tejido hepático con daño leve a menor aumento. B) Zona 1 a mayor aumento con la tinción de DAPI. C) Fluorescencia detectada en el canal del PE para la zona 1. D) Fluorescencia detectada en el canal del FITC para la zona 1. La barra blanca representa 100 μm .

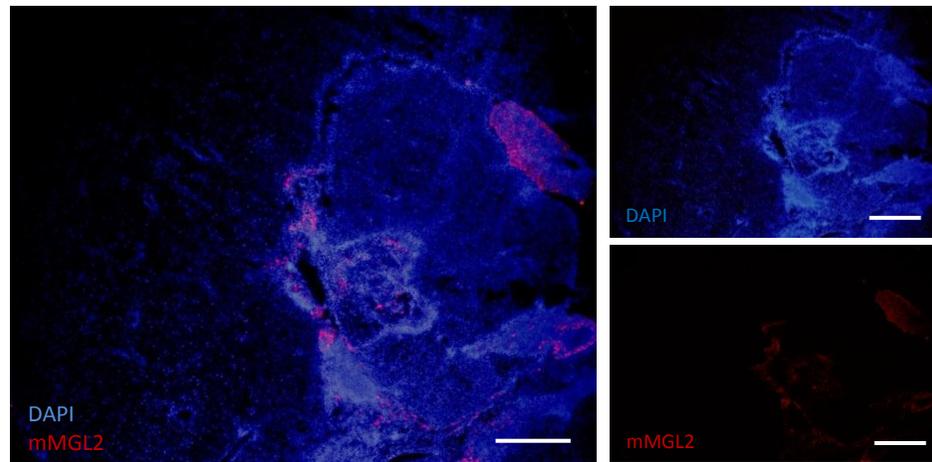
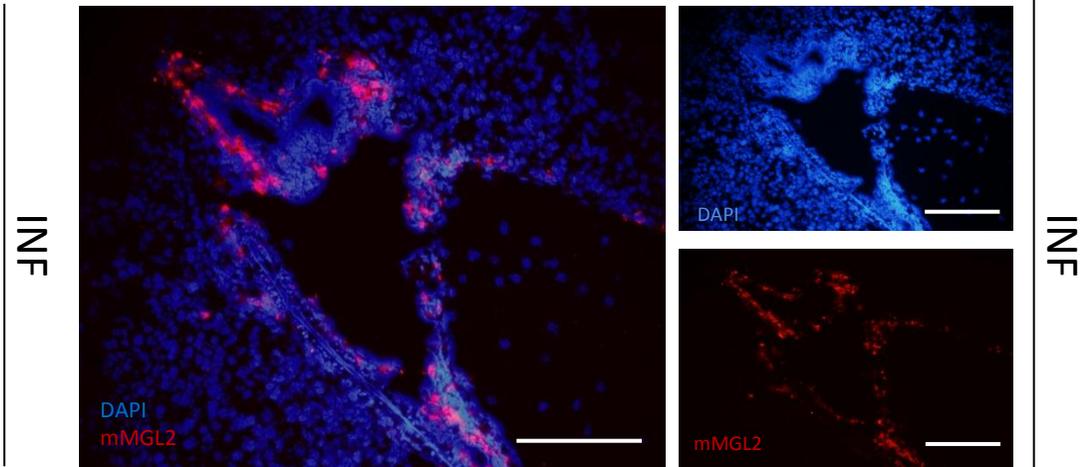
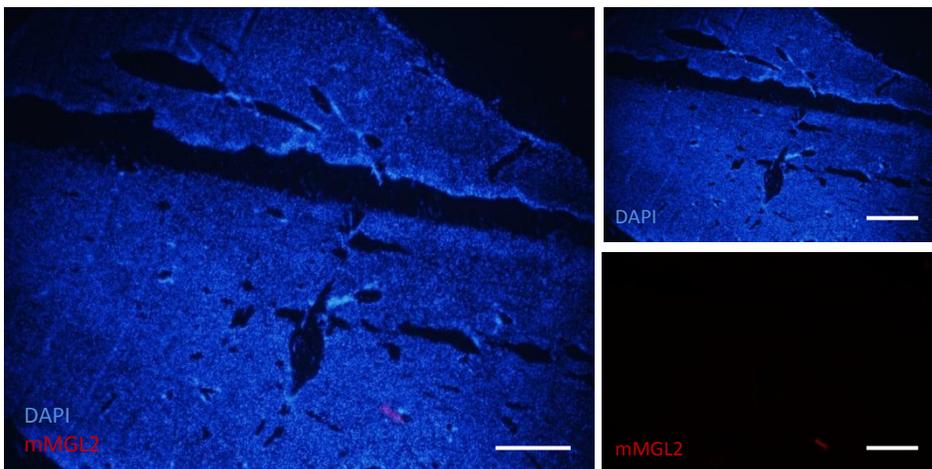
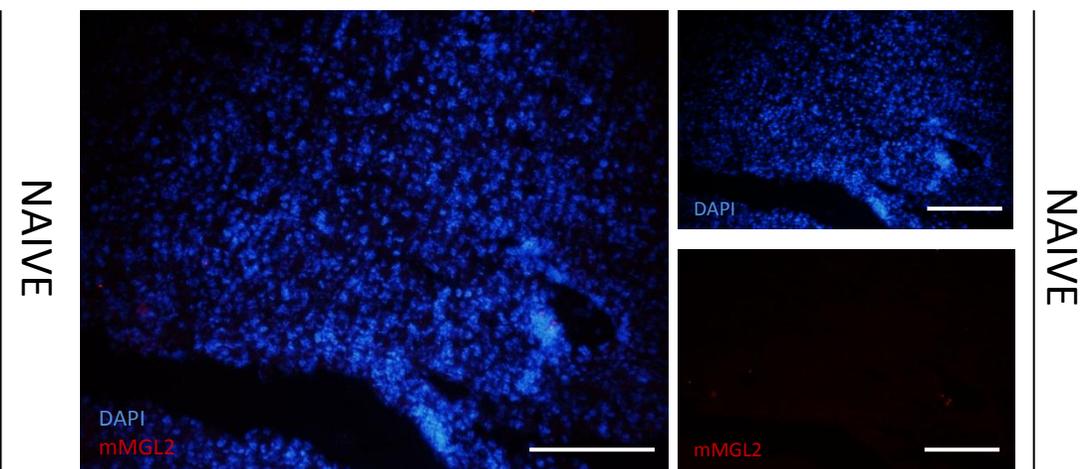
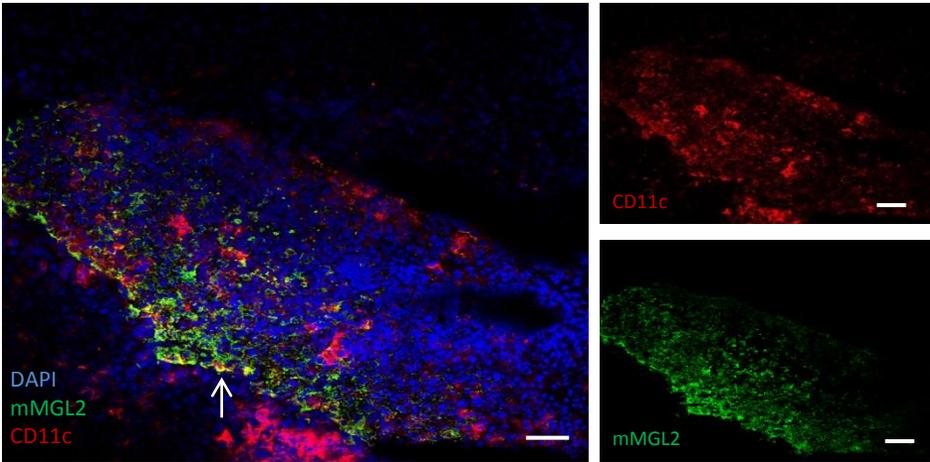
A**B****C****D**

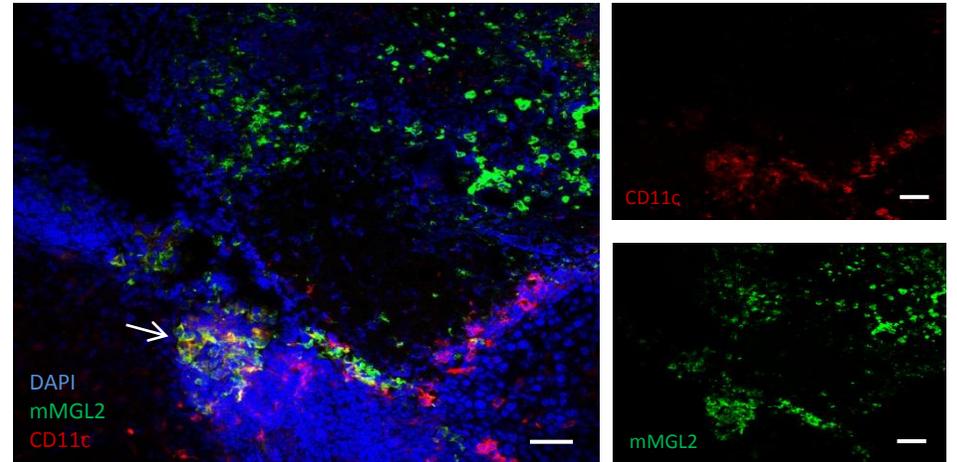
Figura 3.4. Expresión de MGL2 en tejido hepático de ratón infectado y naive (control). Se incubó el tejido con el anticuerpo anti-mMGL2 y al día siguiente se le agregó DAPI. Se observó y se tomaron fotos del tejido con microscopio de epifluorescencia. **A y B)** Hígado con daño leve de animales infectados. **C y D)** Hígado control de animales naive. La barra blanca representa 100 μ m.

A



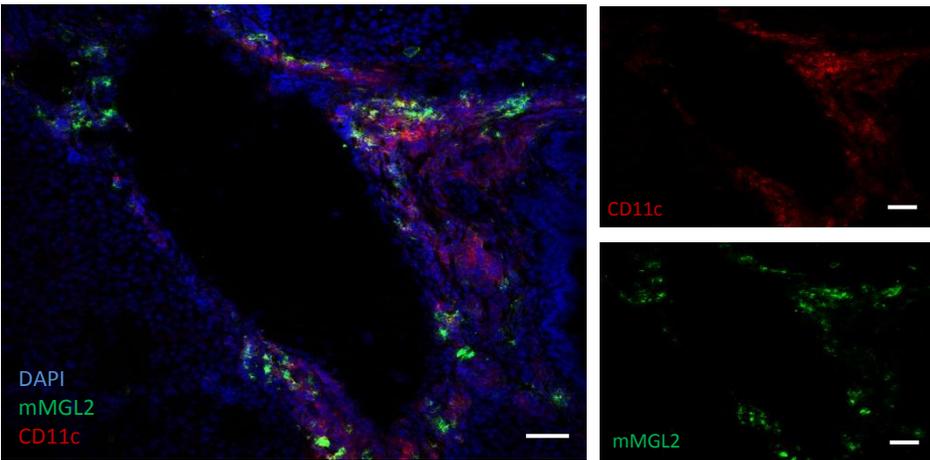
INF

B



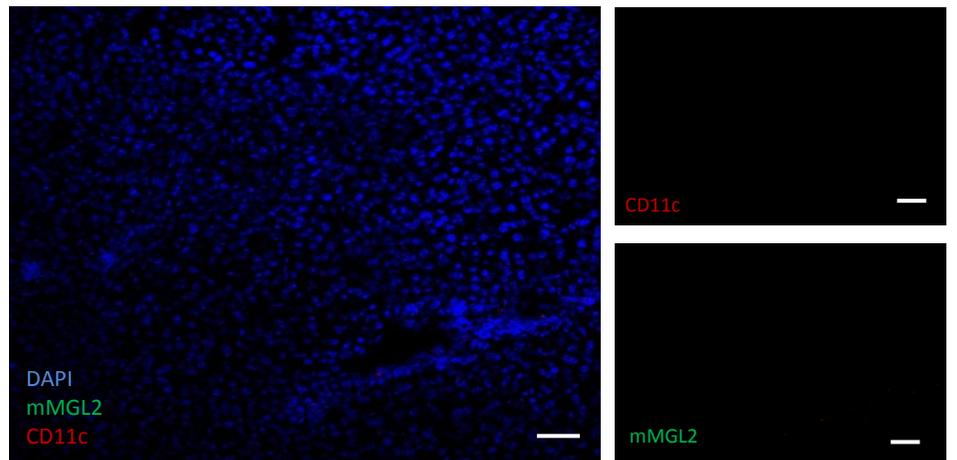
INF

C



INF

D



NAIVE

Figura 3.5. Expresión de CD11c y MGL2 en tejido hepático de ratón infectado y naive (control). Se incubó el tejido con anticuerpos anti-mMGL2 y -CD11c y al día siguiente se le agregó DAPI. Se observó y se tomaron fotos del tejido con microscopio confocal. **A, B y C)** Hígado con daño leve de animales infectados. **D)** Hígado control de animales naive. Las flechas blancas indican co-localización de ambas moléculas. La barra blanca representa 100 μm .

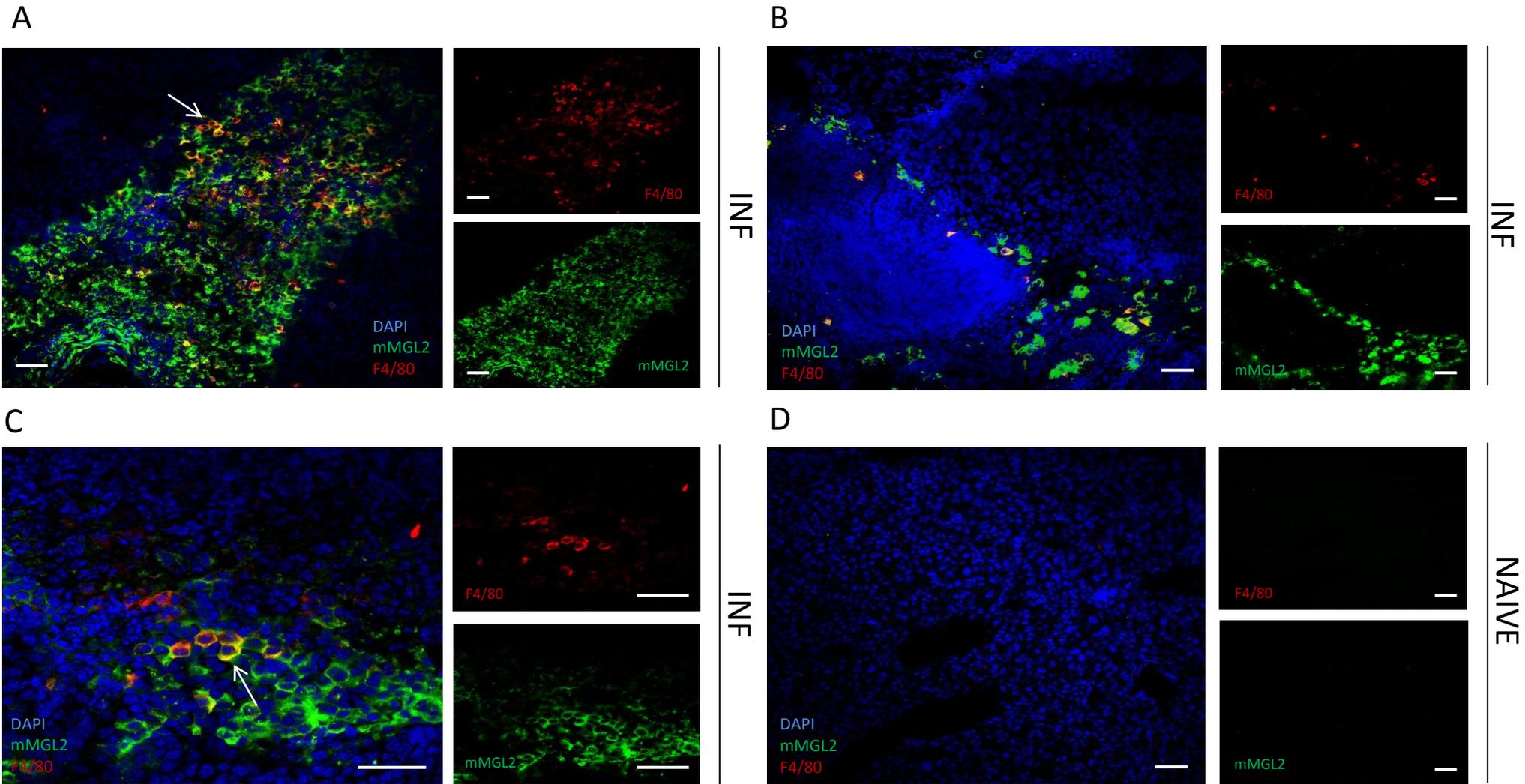


Figura 3.6. Expresión de F4/80 y MGL2 en tejido hepático de ratón infectado y naive (control). Se incubó el tejido con anticuerpos anti-mMGL2 y -F4/80 y al día se agregó DAPI. Se observó y se tomaron fotos del tejido con microscopio confocal. **A, B y C)** Hígado con daño leve de animales infectados. **D)** Hígado control de animales naive. Las flechas blancas indican co-localización de ambas moléculas. La barra representa 100 μm .

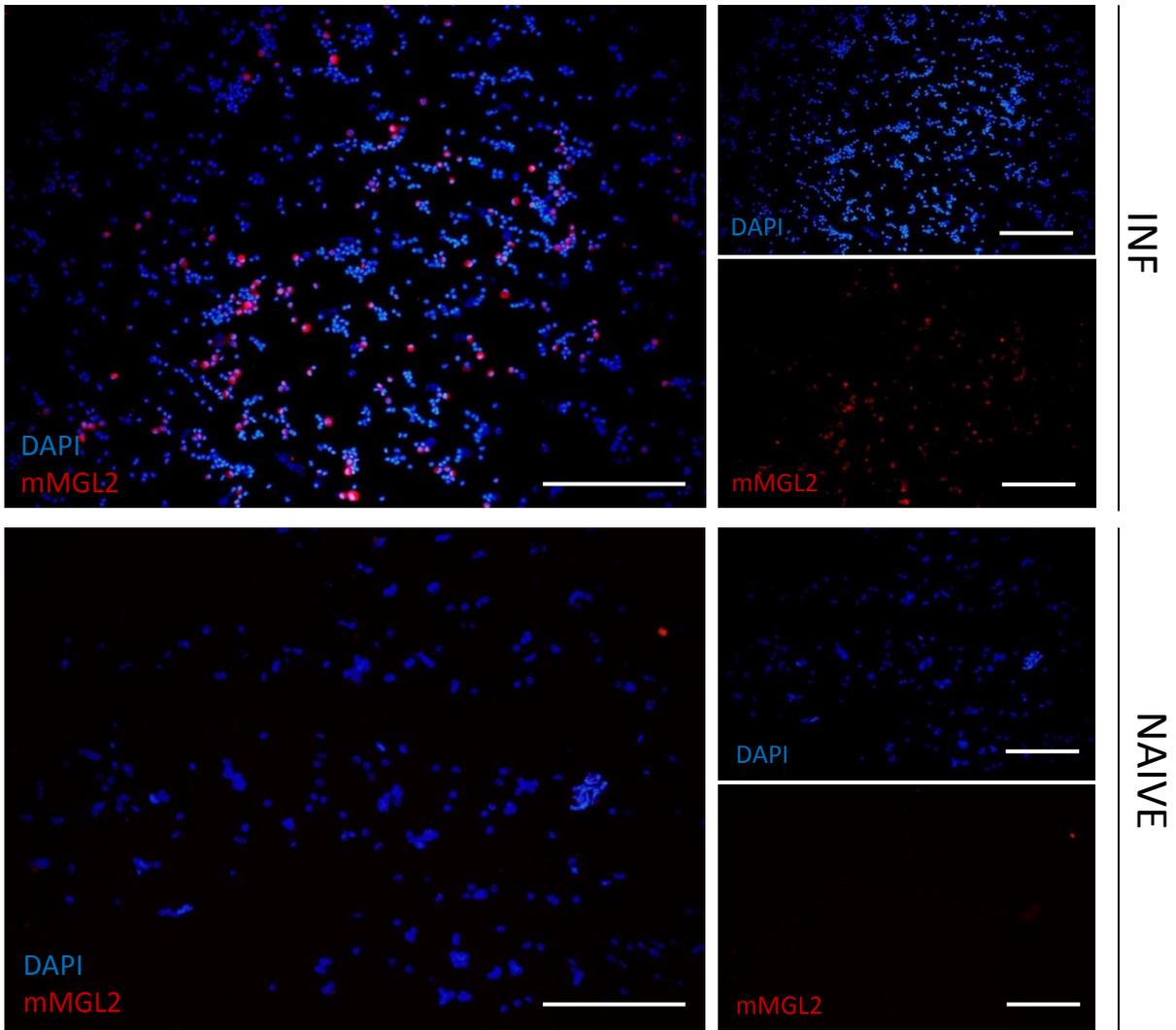


Figura 3.7. Expresión de MGL2 en PEC de ratón infectado y naive (control). Se colocaron las células provenientes del PEC de animales infectados y control (naive) en una lámina de vidrio y se incubaron con el anticuerpo anti-mMGL2. Al día siguiente se le agregó DAPI. Se observó y se tomaron fotos de las células con microscopio de epifluorescencia. La barra blanca representa 100 μm.

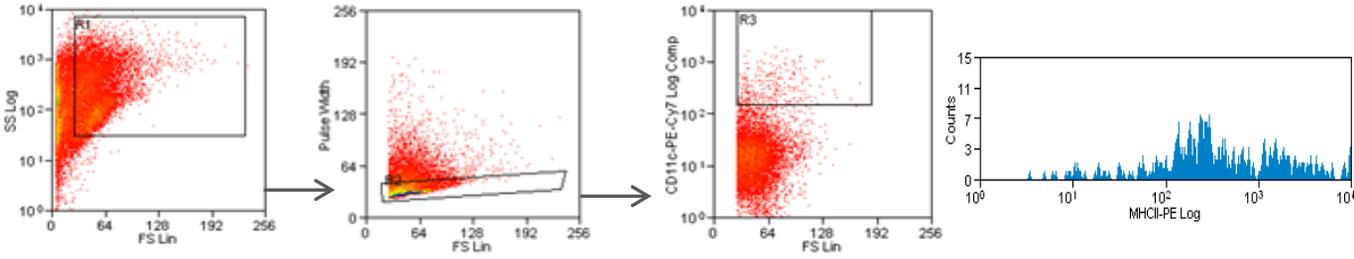
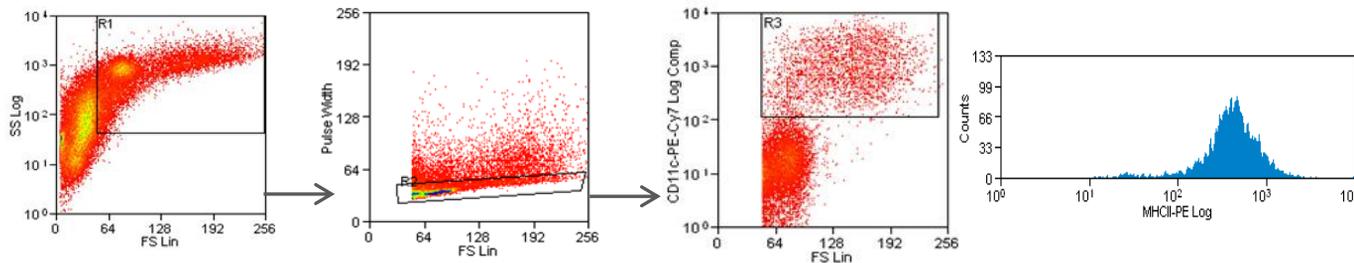
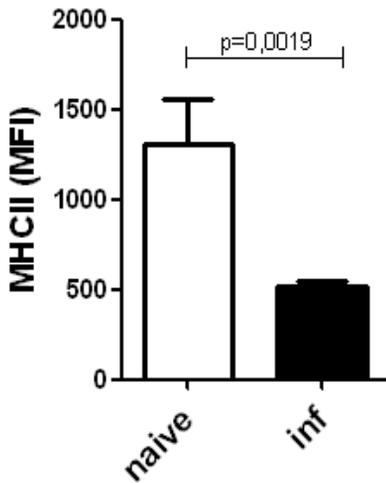
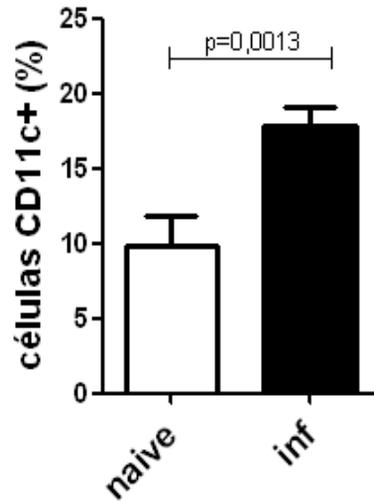
A**B****C****D**

Figura 3.8. Evaluación de la expresión de MHCII en células CD11c⁺ por citometría de flujo. **A)** Estrategia de análisis para las células CD11c⁺ de animales naive (control). A partir de R1 se descartaron los dobletes celulares en R2, para luego seleccionar las células CD11c⁺ en R3. Finalmente, dentro de R3, se midió la expresión de MHC II. **B)** Estrategia de análisis para células CD11c⁺ de animales infectados, que fue similar a la estrategia utilizada para animales no infectados **C)** Cuantificación de la expresión de MHC II en células CD11c⁺ tanto en animales naive como infectados. **D)** Cuantificación de células CD11c⁺ tanto en PEC de animales infectados como no infectados.

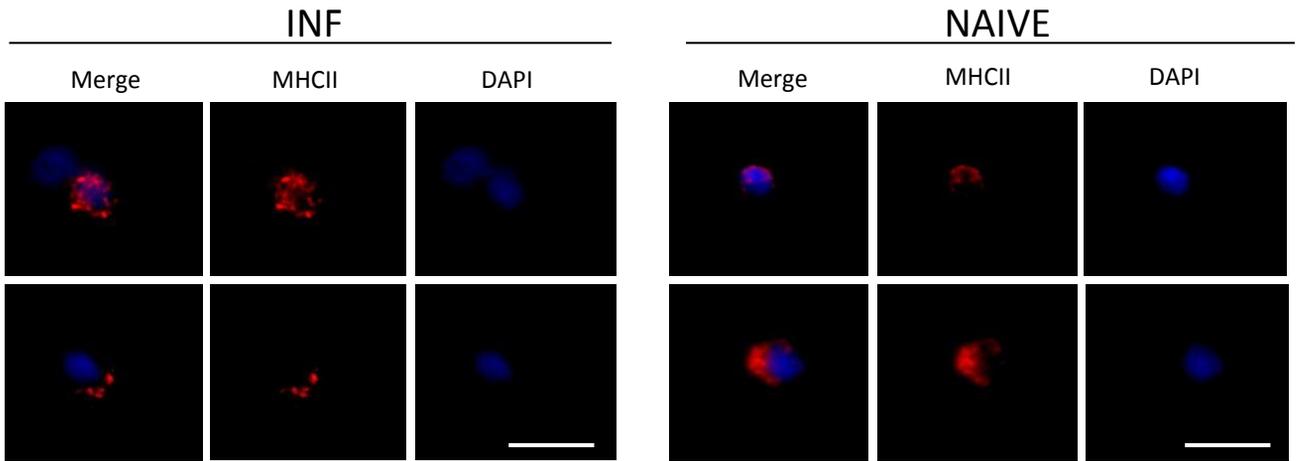


Figura 3.9. Endocitosis de MHCII evaluada mediante microscopía. En ambos casos se incubaron células CD11c⁺ purificadas de la cavidad peritoneal de animales infectados (panel izquierdo) y naive (panel derecho) con el anticuerpo anti-MHCII durante 3 horas a 37°C. La barra blanca corresponde a 100 μ m.

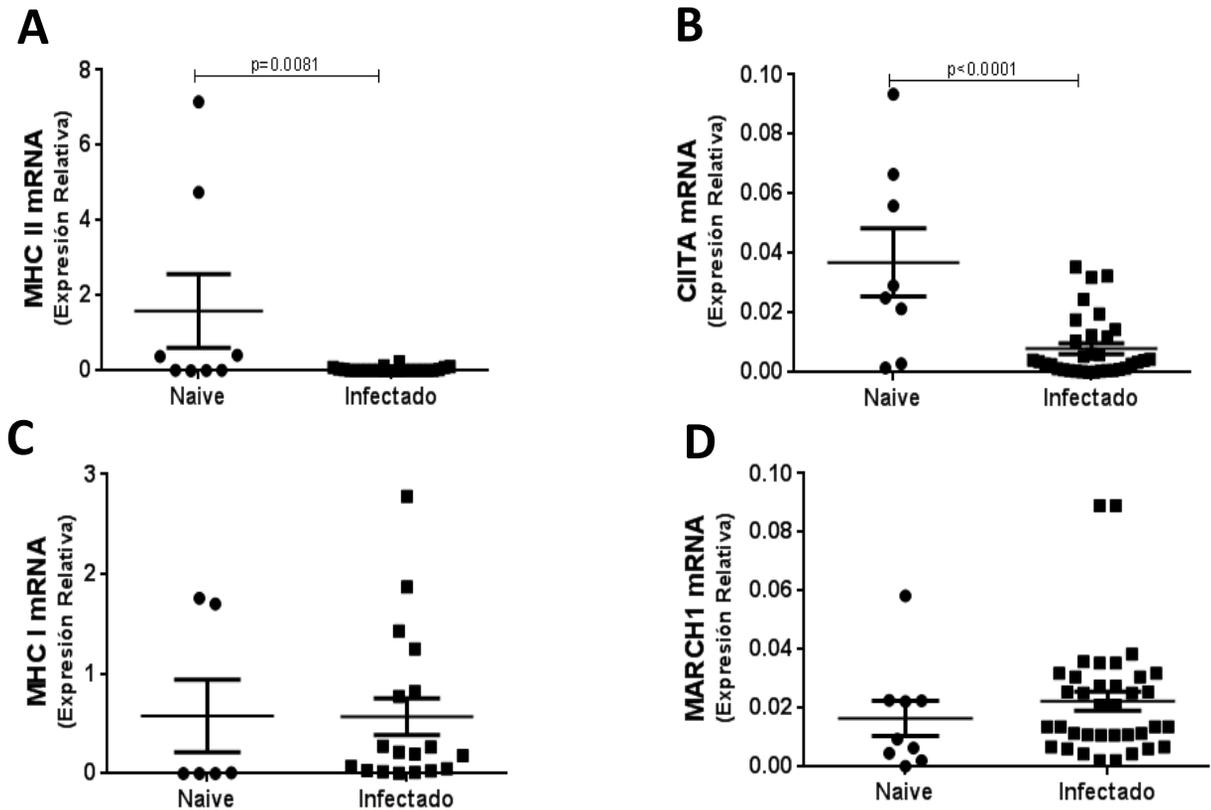


Figura 3.10. Evaluación de la expresión génica de MHCII, CIITA, MHC I y MARCH1 mediante qRT-PCR. Se extrajo el ARN de células CD11c⁺ provenientes de la cavidad peritoneal tanto de animales infectados como naive y luego se sintetizó el ADNC. Posteriormente se realizó la qRT-PCR para cada uno de los genes nombrados anteriormente. La expresión de cada gen se calculó relativa a la expresión del gen constitutivo GAPDH.

4. Discusión

En la presente tesina, nos enfocamos en el estudio de dos aspectos diferentes de la caracterización de las células CD11c⁺ durante una infección murina por *F. hepatica*. En esta sección se discutirán cada uno de ellos por separado.

Parte I: Caracterización por microscopía de células CD11c⁺ en hígado y peritoneo de animales infectados

Se tenía como antecedente que las células CD11c⁺ que provenían de bazo y peritoneo de animales infectados con *F. hepatica* poseían una mayor expresión de la molécula MGL2 que las células CD11c⁺ de animales naive (76). Por este motivo, dado que *F. hepatica* infecta el hígado, resultaba interesante averiguar si en el tejido hepático también se daba la presencia de estas células CD11c⁺ MGL2⁺. Como ya se había llevado a cabo la técnica de citometría de flujo, se pretendió poner a punto el análisis de tejido hepático mediante microscopía de inmunofluorescencia. Esta técnica nunca había sido realizada en nuestro laboratorio. En este sentido, fue necesario evaluar el daño hepático así como conocer las características histológicas que presentaba el hígado murino durante la infección. En dicha puesta a punto salió a la luz de que las zonas necrosadas en los hígados que poseían mucho daño presentaban una alta autofluorescencia, lo cual podía enmascarar la señal específica. Por lo tanto, se investigó si era necesario usar hígados que no presentaran daño severo para poder identificar correctamente las señales específicas.

Los resultados indicaron que el hígado de animales infectados se asocia con la presencia de células CD11c⁺ MGL2⁺. La molécula MGL es una lectina que puede reconocer moléculas glicosiladas presentes en bacterias (77), así como también en virus (83). Además, se vio que MGL puede interactuar con moléculas presentes en parásitos helmintos. Por ejemplo, se vio que *S. mansoni* interactúa con MGL a través de residuos LacdiNAc (84). Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que MGL2 interactúa directamente con lectinas de la superficie de *F. hepatica*, y en particular se demostró que interactúa con el antígeno Tn (76). El resultado obtenido en esta tesina estaría indicando que se reclutan al hígado células MGL2⁺ CD11c⁺ durante la infección, o que se reclutan CD11c⁺ y luego se induce la expresión de MGL2. Este hecho tiene sentido, ya que, dado que MGL interactúa directamente con componentes de *F. hepatica*, la presencia de DCs MGL2⁺ indicaría que las DCs reconocen el parásito *in situ* en el hígado y pueden activar a los linfocitos T para que inicien respuestas inmunes en este órgano.

También se detectaron células MGL2⁺ en la cavidad peritoneal de animales infectados. Dichas células podrían ser más numerosas al inicio de la infección, ya que las metacercarias se desenquistan en el intestino delgado y luego los parásitos juveniles atraviesan la pared intestinal para pasar a la cavidad peritoneal. De esta manera, al inicio de la infección podrían reclutarse una mayor cantidad de células MGL2⁺ a la cavidad peritoneal, y a medida que la

infección avanza y el parásito se aloja en el hígado, células MGL2⁺ son reclutadas hacia este lugar. Otra evidencia que también apoya este hecho es que la gran mayoría de células MGL2⁺ identificadas en el tejido hepático se encontraban en infiltrados leucocitarios, algunos de ellos alrededor de los vasos sanguíneos. Los infiltrados están conformados por células del sistema inmune que vienen de otros órganos, por ejemplo los linfonodos. Para complementar el estudio de las DCs en el hígado, sería interesante evaluar la expresión de la molécula CD103, que es un marcador de DCs que no residen en los linfonodos (81), pero sí de DCs residentes en el hígado. Además de células CD11c⁺ MGL2⁺, también se identificaron en el hígado células F4/80⁺ MGL2⁺. Dado que se ha visto que las DCs pueden expresar también F4/80 aunque en baja cantidad, sería interesante averiguar si estas células F4/80⁺ son las mismas que las CD11c⁺. Para ello, deberíamos realizar una inmunofluorescencia marcando simultáneamente las tres moléculas; CD11c, F4/80 y MGL2 y observar si se da co-localización. Cabe resaltar que en este trabajo no abordamos esta estrategia por no disponer de los anticuerpos conjugados necesarios para el marcado simultáneo y posterior análisis en el microscopio confocal.

En nuestro laboratorio también se evidenció por primera vez que la interacción de MGL2 con el antígeno Tn determina una polarización de la activación de los linfocitos T hacia un fenotipo Th2 (76). En particular, se vio que estos linfocitos T CD4 producían IL-10 y TNF- α . Se observó que al mismo tiempo que se estimulaba la producción de linfocitos Th2, la producción de linfocitos Th1 se veía disminuida (76). Estos resultados se ven reflejados en la figura 4.1, que representa una parte del análisis funcional de estas células CD11c⁺ MGL2⁺. En este ensayo se incubaron dichas células con medio o con antígeno de *F. hepatica*, además de con linfocitos T CD4⁺. Luego de unos días se midió la cantidad de IFN- γ y de IL-10 que habían producido los linfocitos. El IFN- γ es una citoquina típica del subtipo Th1. Se vio que, para los animales infectados, la cantidad de IFN- γ producida por los linfocitos T disminuía, mientras que la cantidad de IL-10 producida aumentaba (Figura 4.1).

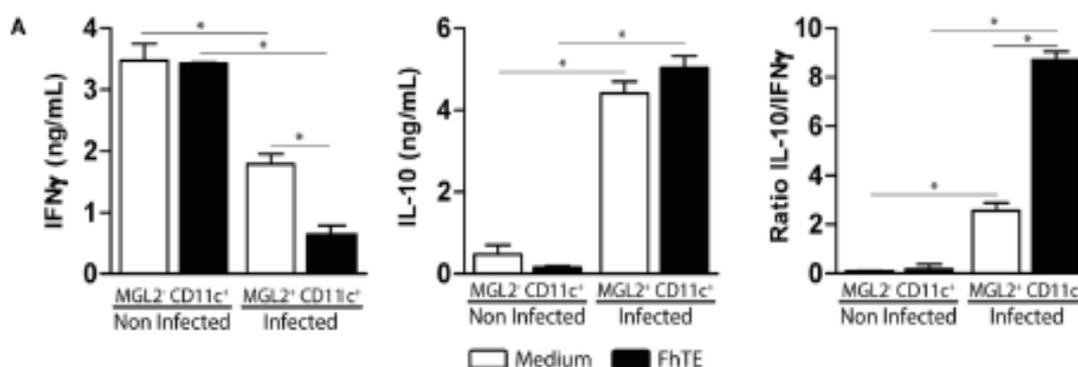


Figura 4.1: Análisis funcional de células CD11c⁺ MGL2⁺. Las células CD11c⁺ del PEC de animales infectados o naive fueron incubadas con FhTE (tegumento de *F. hepatica*) toda la noche a 37C. Luego se lavaron y se incubaron con linfocitos T CD4⁺ de ratones C57BL/6 naive por 5 días a 37C. Se midió la producción de IFN- γ e IL-10 en el sobrenadante por los linfocitos T mediante ELISA. Extraído de (76).

Estos resultados indicarían, por un lado, que a pesar que disminuye la expresión de MHCII en las DCs, las mismas igual pueden activar a los linfocitos T. Por otro lado, estas DCs determinan la activación de linfocitos Th2/Treg productores de IL-10, por lo que podrían ser tolerogénicas.

Por lo tanto, nuestros resultados indicarían que MGL2 tiene una actividad anti-inflamatoria en el contexto de la infección por *F. hepatica*, generando DCs productoras de IL-10, una potente citoquina anti-inflamatoria, y determinando la polarización hacia un fenotipo Th2/Treg de las células T. En la figura 4.2 se esquematiza lo anterior expuesto.

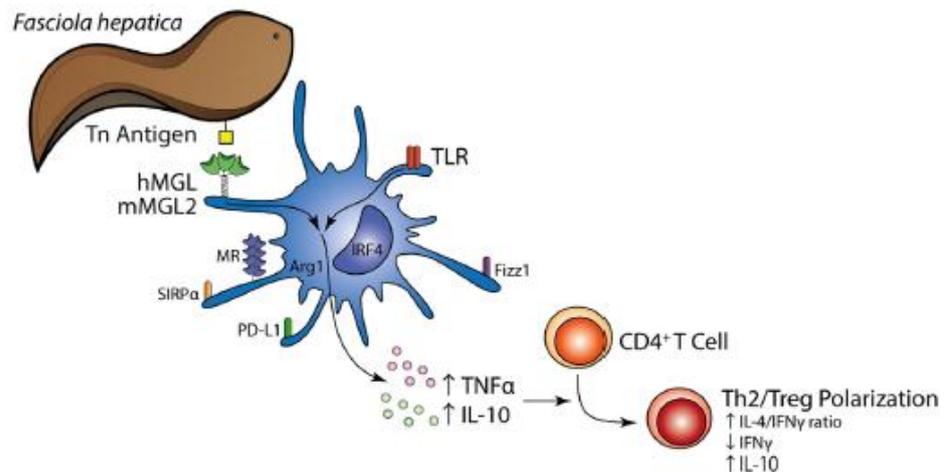


Figura 4.2: Esquema de la función de las células CD11c⁺ MGL2⁺ durante la infección por *F. hepatica*. El antígeno Tn de *F. hepatica* interacciona con MGL expresado en la superficie de la DC, desencadenando un programa regulatorio que termina en la producción de IL-10 y TNF-α por dicha célula, y en la polarización hacia un fenotipo Th2/regulatorio de los linfocitos T. Extraído de (76).

Haciendo referencia a los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo, sería interesante averiguar si las características anteriormente explicadas de estas células CD11c⁺ MGL2⁺ de PEC son similares a las de las células CD11c⁺ MGL2⁺ identificadas en el hígado. En particular, se podría investigar si dichas células presentes en el hígado generan una respuesta T similar a la generada por las células CD11c⁺ MGL2⁺ presentes en el PEC. Para ello, se podría realizar citometría de flujo a partir de tejido hepático, utilizando la técnica de sorting para separar las células CD11c⁺. Posteriormente, se podrían realizar los mismos ensayos funcionales que para las células obtenidas a partir del PEC.

Parte II: Evaluación preliminar de los mecanismos moleculares que conducen a la expresión disminuida de MHCII en células CD11c⁺ peritoneales de animales infectados.

Dados los resultados previos obtenidos por Rodríguez. E en su tesis de doctorado (55, 76), donde se observó que la expresión de MHCII disminuye en animales infectados por *F. hepatica*, en esta tesina se quiso profundizar en los mecanismos moleculares que conducían a dicha disminución. Para ello, en primer lugar, se evaluó la expresión génica tanto de MHCII como de genes relacionados por qRT-PCR. Los resultados obtenidos indican que existe una expresión génica disminuida de MHCII y CIITA en células CD11c⁺ de animales infectados. Por el contrario, la expresión génica de MHCI y MARCH1 no se vio afectada. Esta situación indicaría que la disminución en la expresión de la proteína MHCII se estaría dando por una disminución en la expresión génica, la cual a su vez viene dada por una disminución en la expresión del factor de transcripción CIITA que, como se explicó previamente, regula la transcripción del MHCII (55). Al realizar solamente qRT-PCR, estaríamos detectando ARNm. Para corroborar efectivamente que la disminución en el transcripto llevó a una disminución en la proteína, se podría realizar Western blot con lisados celulares de células CD11c⁺ tanto de animales infectados como naive, incubando con anticuerpos específicos para evaluar la expresión proteica de MHCII y CIITA. Si la hipótesis anteriormente planteada es correcta, se debería obtener una menor expresión en los lisados de células CD11c⁺ de los animales infectados. Dado que por qRT-PCR se vio que la expresión génica de MHCI no se modificó, se podría incluir el MHCI también en el Western blot, donde tampoco debería cambiar.

En cuanto a MARCH1, se tenían antecedentes en la bibliografía que indicaban que dicha molécula es una ubiquitina ligasa (67) que produce la ubiquitinación de residuos de lisina en la molécula de MHCII, promoviendo su degradación y también su endocitosis en DCs (65). Los resultados obtenidos en esta tesina no indican un aumento significativo en la expresión génica de MARCH1 en células CD11c⁺ de animales infectados. Sin embargo, para determinar el rol de MARCH1 en la ubiquitinación del MHCII, y por consiguiente en su degradación, habría que evaluar su actividad enzimática en lisados de células CD11c⁺ peritoneales de los animales infectados. En el caso de encontrar mayor ubiquitinación del MHCII en las células CD11c⁺ de animales infectados con respecto a los controles, podría correlacionarse con una mayor degradación del MHCII. Para corroborar esta hipótesis, deberíamos realizar un Western blot con anticuerpos anti-ubiquitina, a partir de lisados de células CD11c⁺. De esta manera, si la actividad de MARCH1 es mayor en los animales infectados, veríamos un mayor número de bandas en el Western Blot, indicando que se dio una mayor ubiquitinación de MHCII. Para cerciorarnos de que la proteína ubiquitinada que estamos observando es MHCII, sería necesario realizar previamente una inmunoprecipitación con anticuerpos anti-MHCII.

Existen indicios que indican que la citoquina IL-10 dirige la ubiquitinación por MARCH1 y la consecuente degradación de diferentes moléculas, entre ellas el MHCII (68). Por este motivo, disminuye la expresión de la misma en la superficie celular. Trabajos publicados por nuestro grupo de investigación reportaron que las DCs producen una gran cantidad de IL-10 en el contexto de la infección por *F. hepatica* (76). Dados estos antecedentes, se podría pensar que la disminución en la expresión de MHCII en la superficie celular podría darse por el alto nivel de IL-10 que existe en nuestro sistema. Dicha citoquina es producida por las DCs y por los linfocitos T CD4 de animales infectados. Una manera adecuada de corroborar esta hipótesis,

sería utilizar ratones knock-out (KO) condicionales para IL-10, purificando las células CD11c⁺ peritoneales y evaluando tanto la expresión génica de MARCH1 y MHCII mediante qRT-PCR así como la expresión proteica de dichas moléculas mediante Western blot en dichas células. El hecho de que sean KO condicionales nos permite evaluar qué sucede cuando no se da la presencia de IL-10 solo en cierto momento de la infección parasitaria.

Es importante destacar que el modelo de *F. hepatica* utilizado es un modelo complejo. Se han reportado efectos de patógenos sobre la expresión del MHCII por DCs. Los mismos fueron observados en modelos *in vitro* simples, como es el caso de bacterias intracelulares o virus (62,64). En el caso de *F. hepatica*, es necesario infectar a los animales con dicho parásito. Esto implica que los efectos que se observan sobre las DCs son el resultado de un conjunto de procesos complejos que involucran una gran variedad de moléculas, células, órgano, además del parásito propiamente dicho. Por el contrario, en un modelo *in vitro* simple, donde se cultiven DCs con una bacteria intracelular, es posible evidenciar que los efectos que se produzcan sobre la DC, se deberán exclusivamente a la infección de la célula por dicha bacteria intracelular. Una alternativa para simplificar el modelo de *F. hepatica* podría ser cultivar las DCs con moléculas derivadas del parásito, aunque con esta opción no se puede afirmar que dichas células presenten las mismas características que las que se obtendrían si las mismas se purificaran luego de una infección con el parásito.

Otra hipótesis que se tenía acerca de la posible disminución en la expresión de MHCII, era que hubiera una mayor endocitosis de MHCII en las células CD11c⁺ de animales infectados. Para averiguar si la misma se cumplía, se realizaron ensayos de endocitosis incubando las células CD11c⁺ tanto de animales infectados como naive con el anticuerpo anti-MHCII. Los resultados obtenidos indicarían que en las células CD11c⁺ de animales infectados se estaría dando una mayor endocitosis. Esto se ve reflejado en que la expresión de MHCII membranaria se encuentra casi ausente, y se observan pequeñas multivesículas que no están en la membrana. Existen trabajos que reportaron que la presencia de estas multivesículas estaría indicando endocitosis, la cual podría darse a través de lisosomas o endosomas (65). En la presente tesina, para asegurarnos de que efectivamente se esté dando endocitosis a través de vesículas, se podría realizar otra inmunofluorescencia pero utilizando anticuerpos que marquen vesículas, como LAMP-1 y LAMP-2, que son marcadores lisosomales. Además, sería conveniente utilizar algún marcador específico de membrana plasmática, como la lectina WGA. Dicha marcación sería útil para corroborar si cierta molécula, en nuestro caso MHCII, se encuentra en la membrana plasmática o fuera de ella. Otra alternativa para investigar si el MHCII se está endocitando podría ser, a partir de células CD11c⁺, separar los componentes de las mismas por centrifugación diferencial, obteniendo así los componentes membranarios, los vesiculares, los citosólicos y el núcleo. Luego, se podría realizar un Western blot con anticuerpos anti-MHCII con los componentes membranarios y vesiculares. El resultado esperado sería encontrar una menor expresión proteica en las membranas. Esta opción sin embargo es engorrosa de llevar a la práctica.

5. Conclusiones

En esta tesina se profundizó en la caracterización de células CD11c⁺ provenientes de hígado y peritoneo de animales infectados por el parásito *F. hepatica*. Dicha caracterización se enfocó en dos aspectos diferentes: por un lado, continuar con la investigación acerca de las células CD11c⁺ MGL2⁺, identificando las mismas por microscopía tanto en hígado como en PEC de animales infectados y naive. Por otra parte, se realizó un análisis preliminar de los mecanismos moleculares que llevan a la disminución del MHCII en células CD11c⁺ de animales infectados previamente observada.

En cuanto a la primera parte, los resultados indican que se identificaron tanto células CD11c⁺ MGL2⁺ como células F4/80⁺ MGL2⁺ en el tejido hepático de animales infectados, mientras que dichas células no están presentes en el tejido hepático de animales naive. También se observó la presencia de células MGL2⁺ en el PEC de animales infectados, estando también ausentes en el PEC de animales naive.

En la segunda parte, a partir de los resultados obtenidos de qRT-PCR, se observó que la expresión génica tanto de MHCII como de CIITA se vio reducida en células CD11c⁺ de animales infectados, mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión de MHCI y MARCH1. También se determinó una disminución de la expresión de MHCII en células CD11c⁺ peritoneales de animales infectados medida por citometría de flujo. Finalmente, se realizaron ensayos de endocitosis del MHCII por las células CD11c⁺ tanto de animales infectados como naive. Se obtuvo evidencia que sugiere que el MHCII sufre una mayor endocitosis en las células CD11c⁺ peritoneales de animales infectados que en las de los animales naive.

En la figura 5.1 se muestra un esquema de los principales resultados obtenidos en esta tesina. La infección por *F. hepatica* conduce a un reclutamiento de células CD11c⁺ MGL2⁺ tanto en el hígado como en el PEC. Estas células tienen como característica que poseen una expresión génica disminuida de CIITA, lo que a su vez lleva a una disminución en la expresión génica de MHCII. Por otro lado, las células CD11c⁺ MGL2⁺ de animales infectados llevan a cabo una mayor endocitosis del MHCII, el cual podría degradarse en el proteasoma. Este hecho junto con la disminuida expresión génica de CIITA conduce a una disminución en la superficie celular de la molécula de MHCII.

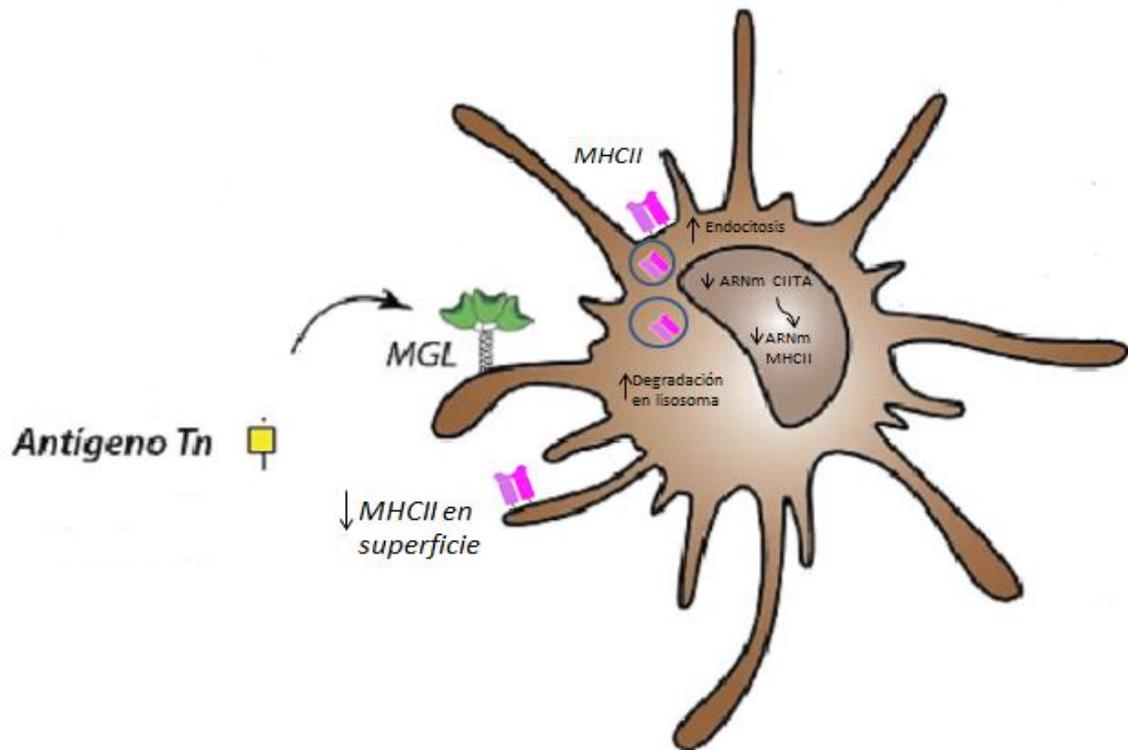


Figura 5.1: Esquema de los principales sucesos que podrían ocurrir en las células $CD11c^+$ $MGL2^+$ de animales infectados con *F. hepatica*. El antígeno Tn interacciona con la molécula MGL que se expresa en la superficie de las células $CD11c^+$. La expresión génica de CIITA disminuye, lo que lleva a la disminución de la expresión génica de MHCII. Un aumento en la endocitosis de la molécula de MHCII de superficie podría regular su expresión en la superficie celular. Un aumento en la ubiquitinación del MHCII podría conducir a su degradación en el lisosoma (no investigado en este trabajo) a pesar de no haber detectado un aumento en la expresión génica de MARCH1. Estos hechos llevarían a una disminución de la expresión del MHCII en superficie.

6. Bibliografía

1. Hotez, P.J., et al., *Helminth infections: the great neglected tropical diseases*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1311.
2. Moreau, E, et al., *Immunity against Helminths: Interactions with the Host and the Intercurrent Infections*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010. P. 1
3. McSorley, H.J., et al., *Helminth infections and host immune regulation*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(4): p. 585.
4. Hotez, P.J., et al. *Incorporating a rapid impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria*. PLoS Med, 2006. **3**:e102.
5. Piedrafita, D, et al., *Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology*. Parasite Immunology, 2010. **32**(8): p.572.
6. Mas-Coma S, et al., *Adaptation capacities of Fasciola hepatica and their relationships with human fasciolosis: from below sea level up to the very high altitude*. Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites, 2003. P 81-123.
7. Spithill, T, et al., *Fasciola gigantica: epidemiology, control, immunology and molecular biology*. Fasciolosis, 1999. P 465-525.
8. Mas-Coma, S., et al., *Chapter2. Fasciola, Lymnaedis and Human Fasciolosis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control*. Adv Parasitol 2009. **69**: p.41-146.
9. World Health Organization, *Report of the WHO Informal Meeting on Use of Triclabendazole in Fasciolosis Control*, 2006: Geneva, Switzerland.
10. López Lemes,M., et al., *Fascioliasis en la República Oriental del Uruguay*. Rev Med Uruguay 1996. **12**: p.37-43.
11. César, D., *Fasciolosis en Bovinos y Ovinos*. **109**: p. 48-51.
12. Sanchís,J., et al., *Seroprevalencia de la fasciolosis bovina en el departamento de Salto (Uruguay)*. Rev Ibero-Latinoam Parasitol 2011. **70**: p. 163-171.
13. Lammas, DA., et al., *The shedding of the outer glycocalyx of juvenile Fasciola hepatica*. Vet Parasitol, 1983. **12**: p. 165-178.
14. Boray, J.C., *Experimental Fascioliasis in Australia*, in Adv Parasitol, D. Ben, Editor 1969, Academic Press. p. 95-210.
15. Moazeni, M., et al., *Controversial aspects of the life cycle of Fasciola hepatica*. Experimental Parasitology, 2016.
16. Keiser, J., et al., *Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis*. Expert Opin Investig Drugs, 2005. **14**(12): p. 1513-26.
17. Coles, G.C., *Anthelmintic resistance--looking to the future: a UK perspective*. Res Vet Sci, 2005. **78**(2): p. 99-100.
18. Dalton, J.P., et al., *Immunomodulatory molecules of Fasciola hepatica: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development*, 2013. **195**(3-4): p. 272-285.
19. Fainboim, L.G., Geffner, J., La respuesta inmunitaria: Conceptos Introductorios en "Introducción a la inmunología humana", 6ta Edición, 2011.
20. Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S., Inmunidad Innata en "Inmunología Celular y Molecular", 6ta Edición, 2008: p. 19-46.
21. Lanier, L.L., *Shades of grey — the blurring view of innate and adaptive immunity*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(2): p. 73-74.
22. Murphy, K.T., Walport, M., Inmunidad mediada por células T en "Inmunobiología de Janeway". 7ma Edición, 2009: p. 323-377.
23. Dalod, M., et al., *Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming*. EMBO J, 2014. **33**(10): p. 1104-16.

24. Puhr, S., et al., Dendritic cell development- History, advances and open questions. *Semin Immunol*, 2016.
25. Guillemins, M., et al., Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(8): p. 571-578.
26. Vremec, D., et al., CD4 and CD8 expression by dendritic cells subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol*, 2000. **164**(6): p. 2978-2986.
27. Raker, V.K., et al., *Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 569.
28. Jenne, CN., et al., *Immune surveillance by the liver*. *Nat Immunol*. 2013. **14**: p. 996-1006.
29. Horner, SM., et al., *Activation and evasion of antiviral innate immunity by hepatitis C virus*. *J Mol Biol*, 2014. **426**: p. 1198-1209.
30. Krueger, P., et al., *Liver-resident CD103⁺ dendritic cells prime anti-viral CD8⁺ T cells in situ*. *J Immunol*, 2016. **194**(7): p. 3213-3222.
31. Zelensky, A.N., et al., *The C-type lectin-like domain superfamily*. *FEBS J*, 2005. **272**(24): p.6179-217.
32. Sancho, D., et al., *Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 491-529.
33. Palucka, A.K., et al., the Basis of Oncoimmunology. *Cell*, 2016. **164**(6): p. 1233-47
34. Finlay, C., et al., Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immun Rev*, 2014. **259**: p. 206-230.
35. van Die, I., et al., Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? . *Glycobiology*, 2010. **20**(1): p. 2-12.
36. McSorley, H., et al., *Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators*. *International Journal for Parasitology*, 2013. **43**: p. 301-310.
37. Jankovic et al., *Parasite-induced Th2 polarization is associated with down-regulated dendritic cell responsiveness to Th1 stimuli and a transient delay in T lymphocyte cycling*. *J Immunol*, 2004. **173**: p. 2419-2427.
38. O'Neill, S.M., et al., *Fasciola hepatica infection downregulates Th1 responses in mice*. *Parasite Immunol*, 2000. **22**(3): p. 147-55.
39. Robinson, M.W., et al., *Fasciola hepatica: the therapeutic potential of a worm secretome*. *Int J Parasitol*, 2013. **43**(3-4): p. 283-91.
40. Flynn, R.J., et al., *Experimental Fasciola hepatica infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis*. *Infect Immun*, 2007. **75**(3): p. 1373-81.
41. Kelly, DS., et al., *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**: p 73-80.
42. Anthony, RM., et al., *Memory Th2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites*. *Nat Med*, 2006. **12**: p. 955-960.
43. Falcón C., et al., *Excretory-secretory products (ESP) from Fasciola hepatica induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010. **137**: p 36-46.
44. van der Kleij, D., et al., *A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization*. *J Biol Chem*, 2002. **277**: p. 48122-48129.
45. McKay, D.M., *The therapeutic helminth?* *Trends Parasitol*, 2009. **25**(3): p. 109-14.
46. Pearson DJ., et al., *The influence of the nematode Symphacia oblevata on adjuvant arthritis in the rat*. *Immunology*, 1975. **29**: p 391-396.
47. La Flamme AC., et al., *Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Infect Immun*, 2003. **71**: p. 4996-5004.
48. Walsh KP., et al., *Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF- β mediated suppression of Th17 and Th1 responses*. *J. Immunol*, 2009. **183**: p. 1577-1586.

49. Finlay, C.M., et al., *Helminth Products Protect against Autoimmunity via Innate Type 2 Cytokines IL-5 and IL-33, Which Promote Eosinophilia*. J Immunol, 2016. **196**(2): p. 703-14.
50. Correale, J., et al., *Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2007. **61**(2): p. 97-108.
51. Correale, J., et al., *The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2011. **233**(1-2): p. 6-11.
52. Dowling, D.J., et al., *Major secretory antigens of the helminth Fasciola hepatica activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses*. Infect Immun, 2010. **78**(2): p. 793-801.
53. Falcon, C., et al., *Excretory-secretory products (ESP) from Fasciola hepatica induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells*. Vet Immunol Immunopathol, 2010. **137**(1-2): p. 36-46.
54. Vukman, K., et al., *Fasciola hepatica tegumental coat impairs mast cells' ability to drive Th1 immune responses*. J Immunol, 2013. **190**: p. 2873-9.
55. Rodríguez, E., et al., *Glycans from Fasciola hepatica Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced Maturation of Dendritic Cells*. PLoS Negl Trop Dis, 2016. **9**(12): p. e0004234.
56. Suzuki, K., et al., *Histone Acetylation and the Regulation of Major Histocompatibility Class II Gene Expression*. Advances in Protein Chemistry and and Structural Biology, 2017. **106**: p. 1623-1876.
57. Lapaque, N., et al., *Salmonella regulates polyubiquitination and surface expression of MHC class II antigens*. PNAS, 2009. **106**: p. 14052-14057.
58. Reith, W., et al., *Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(10): p. 793-806.
59. Dziembowska, M., et al., *Three novel mutations of the CIITA gene in MHC class II-deficient patients with a severe immunodeficiency*. Immunogenetics, 2002. **53**(10-11): p. 821-829.
60. Wright, K.L., et al., *CIITA stimulation of transcription factor binding to major histocompatibility complex class II and associated promoters in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(11): p. 6267-6272.
61. Ballachanda, N., et al., *CIITA and its dual roles in MHC gene transcription*. Front Immunology, 2013. **4**(476).
62. Velásquez, L., et al., *Brucella abortus down-regulates MHC class II by the IL-6-dependent inhibition of CIITA through the down-modulation of IFN regulatory factor-1 (IRF-1)*. Journal of Leukocyte Biology, 2017. **101**
63. Haibo, S., et al., *Recombinant Lipoprotein Rv1016c Derived from Mycobacterium tuberculosis Is a TLR-2 Ligand that Induces Macrophages Apoptosis and Inhibits MHC II Antigen Processing*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016. **6**(147)
64. Redpath, S., et al., *Murine Cytomegalovirus Infection Down-Regulates MHC Class II Expression Macrophages by Induction of IL-10*. J Immunol, 1999. **162**: p. 6701-707.
65. van Niel, G., et al., *Dendritic Cells Regulate Exposure of MHC Class II at their Plasma Membrane by Oligoubiquitination*. Immunity, 2006. **25**: p. 885-894.
66. Oh, J., et al., *MARCH1-mediated MHCI ubiquitination promotes dendritic cell selection of natural regulatory T cells*. The Journal of Experimental Medicine, 2013. **210**(6): p. 1069-1077.
67. Walseng, E., et al., *Dendritic cell activation prevents MHC Class II ubiquitination and promotes MHC class II survival regardless of the activation stimulus*. J Biol Chem, 2010. **285**: p. 41749-41754.
68. Tze, L.E., et al., *CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation*. The Journal of Experimental Medicine, 2011. **208**: p. 149-165.
69. Cho, K., et al., *Ubiquitination by MARCH1 prevents MHC class II recycling and promotes MHC class II turnover in antigen-presenting cells*. PNAS, 2015. **112**(33): p. 10449-10454.

70. van Kooyk, Y., et al., *Novel insights into the immunomodulatory role of the dendritic cell and macrophage-expressed C-type lectin MGL*. Immunobiology, 2015. **220**(2): p. 185-92.
71. Singh, S.K., et al., *Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: distinct glycan specificities and tumor binding properties*. Mol Immunol, 2009. **46**(6): p. 1240-1249.
72. Zizzari, I.G., et al., *MGL Receptor and Immunity: When the Ligand Can Make the Difference*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 450695.
73. van Vliet, S.J., et al., *Human T cell activation results in extracellular signal-regulated kinase (ERK)-calcineurin-dependent exposure of Tn antigen on the cell surface and binding of the macrophage galactose-type lectin (MGL)*. J Biol Chem, 2013. **288**(38): p. 27519-32.
74. van Vliet, S.J., et al., *The C-type lectin macrophage galactose-type lectin impedes migration of immature APCs*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3148-55.
75. Li, D., et al., *Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells*. J Exp Med, 2012. **209**(1): p. 109-21.
76. Rodríguez, E., et al., *Fasciola hepatica Immune Regulates CD11c⁺ Cells by Interacting with the Macrophage Gal/GalNAc Lectin*. Front Immun, 2017. **8**:264. doi: 10.3389/fimmu.2017.00264
77. Huang, A., et al., *Sources of Structural Autofluorescence in the Human Trabecular Meshwork*. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013. **54**: p. 4813– 4820.
78. Shin, J., et al., *Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination*. Nature, 2006. 444. Doi: 10.1038/nature05261.
79. Vukman KV., et al., *Mannose receptor and macrophage galactose-type lectin are involved in Bordetella pertussis mast cell interaction*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(3): p. 439-48.
80. Upham JP., et al., *Macrophage receptors for influenza A virus: role of the macrophage galactose-type lectin and mannose receptor in viral entry*. J Virol, 2010. **84**(8): p. 3730-7.
81. Meevissen MH., et al., *Specific glycan elements determine differential binding of individual egg glycoproteins of the human parasite Schistosoma mansoni by host C-type lectin receptors*. Int J Parasitol, 2012. **42**(3): p. 269-77.