



Tesis de grado para optar al Título de Licenciado en Bioquímica

“Análisis del perfil de expresión de los receptores linfocitarios CD5 y CD6 en el contexto de la hidatidosis secundaria murina”

Presentado por:

Bachiller Joaquín García Luna

Tutor:

Dr. Gustavo Mourglia Ettlin

Montevideo, Uruguay

2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a **toda mi familia** (especialmente a Elena, Dora, Mauro, Cata, Olga, Carolina, Daniel, Leonardo y Jacqueline), que son los primeros en bancarme en todo sentido. En segundo lugar, a **Gus**, por ser un gran tutor, siempre atento y dispuesto al diálogo. En tercer lugar, a toda la **“Casita Adelante”** de la Cátedra de Inmunología (Boti, Clau, Emi, Javier, José, Vero, Euge, Ceci, Pau, Marco, Rodrigo, Gus y Seba) por la buena onda y el compañerismo, especialmente a **Seba Miles**, que fue una especie de “segundo tutor” cuando Gus no estuvo en el país. En cuarto lugar, a la **Cátedra de Inmunología completa** por el cálido ambiente de trabajo que se genera entre todos día a día.

En quinto lugar, a **todos mis amigos**: a mis ex compañeros del Colegio Yvyrá (Seba Barbitta, Joaco Luna, Fede Fernández e Iván), a los que nos une la música (Iván, Juan Pedro, Andrés, Joaco Hurtado, Colo y Mauro), a los de mi barrio (Nacho, Manu y Emi Kercmar), a los “del estadio” (Mauro, Nacho, Luana, Mateo, Quiro, Colo, Martín y Fede Máspoli), a los integrantes de Katana Dojo (en especial a Helena, Juan Pablo, Andrea y Mauricio), a los que han sido y son parte del Tu Madre Fútbol Club (Joaco Garat, Marcio, Guille, Mateo, Mati, Mathi, Nacho, Ernesto, RoPi, Nano, Seba Carbone y su familia, Seba Rey, Emi Grecco, Dioni, Mauro, Cristian, Marcos, Santi Sastre y Santi Battagliese) y a Joaco Pegoraro, un amigo “de la vida”.

Por último, y no por eso menos importante, a **lo más bonito que me llevo de la Facultad**: el **espectacular grupo** de compañeros de estudio, pero sobre todo de **amigos**, que hemos ido formando casi desde el inicio de 2014 y a lo largo de estos cuatro años (Sole, Pedro, Alejo, Anita, Juli, Alina, Cami, Jime, Clari, Cristian, Guille, Catita, Sofi, Lu, Marcio, Matilde, Joaco Garat, Marcos, Flo, Tania, Santi, Vera, Adrián, Rosina y Vale).

En definitiva, pienso que en la vida de la única cosa que realmente somos dueños es de nuestro propio tiempo (y a veces, ni eso). Así que, los agradecimientos van dirigidos a quienes han compartido parte del suyo conmigo, antes y durante esta etapa.

De todo corazón, ¡muchas gracias!

RESUMEN

La equinococosis quística (EQ) -una zoonosis de distribución cosmopolita causada por el parásito cestodo *Echinococcus granulosus*- es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad desatendida generadora de impactos socio-económicos altamente negativos. En el caso de los humanos, considerados hospederos intermediarios accidentales, la denominada EQ secundaria se considera un problema grave asociado al procedimiento quirúrgico de remoción de quistes hidáticos primarios. El modelo murino de EQ secundaria ha sido extensamente validado para el estudio de distintos aspectos relacionados con la infección. En este sentido, nuestro grupo reportó la existencia de diferente susceptibilidad a la EQ secundaria murina según la cepa de ratones utilizada: los ratones Balb/c son más susceptibles que los C57Bl/6. Por otro lado, la subpoblación de linfocitos B1a ha sido sugerida como un actor celular clave en el desarrollo de infecciones por helmintos. Interesantemente, se ha reportado que los ratones de las cepas Balb/c y C57Bl/6 presentan diferencias en el número de dichas células. Por otro lado, los linfocitos B1a y T son los principales tipos celulares donde se co-expresan los receptores CD5 y CD6, pertenecientes a la superfamilia de receptores *scavenger* ricos en cisteína. Entre otras funciones, estas moléculas han sido descritas como receptores de reconocimiento para patrones de patógenos frente a un abanico amplio de los mismos, como ser bacterias, hongos y virus. En este sentido, nuestro grupo reportó recientemente que ambos receptores también son capaces de reconocer antígenos parasitarios presentes en el tegumento de protoscolecis de *E. granulosus*.

En el presente trabajo, nos propusimos analizar las variaciones en el perfil de expresión de CD5 y CD6 sobre linfocitos T y B -de bazo y cavidad peritoneal- obtenidos de ratones C57Bl/6 y Balb/c en el contexto de la EQ secundaria experimental. Asimismo, exploramos *in vitro* los efectos inducidos por antígenos tegumentarios sobre la expresión de dichas moléculas sobre células peritoneales. Los resultados obtenidos mostraron diferencias interesantes entre cepas de ratones, y serán el punto de partida para el desarrollo de esta nueva línea de trabajo sobre la capacidad de los receptores CD5 y CD6 de interactuar con antígenos de parásitos helmintos.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Helmintos parásitos: grupos y características biológicas.	1
1.2.	Respuesta inmune frente a las infecciones por helmintos parásitos.	3
1.3.	<i>Echinococcus granulosus</i> : características biológicas y ciclo de vida.....	5
1.4.	Equinococosis quística.....	6
1.5.	Modelo murino de equinococosis quística secundaria.....	10
1.6.	Superfamilia de receptores <i>scavengers</i> ricos en cisteína: estructura, distribución y funciones.	15
1.7.	Receptores CD5 y CD6: estructura, distribución y funciones.	16
1.8.	CD5 y CD6 como receptores de reconocimiento de patógenos.....	17
1.9.	Contexto y punto de partida.	19
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	21
2.1.	Hipótesis de trabajo.	21
2.2.	Objetivo general.	21
2.3.	Objetivos específicos.....	21
2.3.1.	Objetivo específico #1.	21
2.3.2.	Objetivo específico #2.	21
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1.	Animales.....	22
3.2.	Parásitos.....	22
3.3.	Obtención del extracto PSEx.	22
3.4.	Cuantificación de proteínas en PSEx.....	23
3.5.	Infecciones experimentales.	23
3.6.	Obtención de células peritoneales y esplenocitos.	23
3.7.	Cultivos de células peritoneales.	24
3.8.	Marcado celular para caracterización por citometría de flujo.	24
3.9.	Estrategia de análisis de los resultados obtenidos por citometría de flujo.....	25
3.10.	Análisis estadístico.	26
4.	RESULTADOS	27
4.1.	Caracterización de las poblaciones linfocitarias CD5 ⁺ y CD6 ⁺ durante la etapa temprana de la EQ secundaria.	27
4.1.1.	Caracterización de las poblaciones linfocitarias peritoneales.	27
4.1.1.1.	Caracterización de las poblaciones peritoneales CD3 ⁺ que expresan CD5 o CD6.....	30

4.1.1.2. Caracterización de las poblaciones peritoneales CD19 ⁺ que expresan CD5 o CD6.....	32
4.1.2. Caracterización de las poblaciones linfocitarias en bazo.....	34
4.1.2.1. Caracterización de las poblaciones esplénicas CD3 ⁺ que expresan CD5 o CD6.....	37
4.1.2.2. Caracterización de las poblaciones esplénicas CD19 ⁺ que expresan CD5 o CD6.....	38
4.1.3. Intensidad de expresión de CD5 y CD6: Análisis comparativo entre linfocitos peritoneales y esplénicos.	40
4.2. Efecto de los antígenos tegumentarios de PSC sobre la expresión de CD5 y CD6 en linfocitos peritoneales.	43
4.2.1. Efectos de PSEx sobre las poblaciones linfoides CD3 ⁺ y CD19 ⁺	43
4.2.2. Efectos de PSEx sobre la expresión de CD5 y CD6 en linfocitos CD3 ⁺	44
4.2.3. Efectos de PSEx sobre la expresión de CD5 y CD6 en linfocitos CD19 ⁺	46
5. DISCUSIÓN	49
6. REFLEXIONES Y COMENTARIOS FINALES	58
7. BIBLIOGRAFÍA	59

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Helmintos parásitos: grupos y características biológicas.

El término helminto (del griego *hélminthos*) significa gusano y se utiliza para agrupar diversos organismos multicelulares eucariotas invertebrados que presentan simetría bilateral y tienen forma de “tubo” o “cinta aplanada”. Los helmintos pueden ser de vida libre o parásitos. De hecho, gran parte de los animales vertebrados son hospederos de helmintos parásitos. A modo de generalidad, estos últimos atraviesan por tres etapas durante su ciclo vital: huevo, larva (o juvenil) y gusano adulto; pudiendo requerir de dos o más hospederos para completar el ciclo. Los helmintos parásitos se clasifican en tres grupos: cestodos, trematodos y nematodos; caracterizándose los dos primeros grupos por ser gusanos planos (platelmintos) [Castro, 1996].

Los cestodos tienen forma de cinta, son segmentados y principalmente parásitos intestinales. No ingieren material particulado ya que no poseen sistema digestivo; en su lugar, absorben directamente los nutrientes a través de su tegumento, el cual presenta gran cantidad de microvellosidades. La anatomía del gusano adulto está compuesta por una cabeza (denominada escólex) que presenta ganchos y ventosas que tienen como función la fijación a la pared intestinal de su hospedero, un cuello y un cuerpo (denominado estróbila) formado por una serie de segmentos llamados proglótides. Cada una de ellas desarrolla un juego completo de órganos reproductores (femeninos y masculinos) que producen huevos fertilizados. Las proglótides maduras, llenas de huevos y que se localizan en la porción final del organismo, pueden romperse y liberarse al medio exterior junto con las heces del hospedero [Castro, 1996; Harvey *et al.*, 2007].

Los trematodos poseen forma de hoja y son capaces de infestar diferentes órganos, dependiendo de la especie. Su ciclo vital puede presentar uno o varios hospederos intermediarios, y siempre uno de ellos es un caracol de agua dulce. Poseen una ventosa oral y una ventral para adherirse a los tejidos de su hospedero. Además, presentan un canal alimentario con faringe y esófago. Sus intestinos se componen de una sola capa de células epiteliales y tienen forma de tubo bifurcado. La mayoría de las especies son hermafroditas (excepto los miembros del género *Schistosoma*) [Castro, 1996; Harvey *et al.*, 2007].

Por último, y a diferencia de los platelmintos, los nematodos son gusanos cilíndricos que suelen desarrollarse en un único hospedero. Presentan un cuerpo recubierto por una cutícula acelular externa, una hipodermis fina y gran musculatura. Su canal alimentario es completo, es decir con boca y ano, presentando la primera labios con papilas sensoriales. El esófago de los nematodos bombea alimento hacia el intestino gracias a su naturaleza muscular. El intestino es tubular y se compone por una única capa de células columnares con prominentes microvellosidades en la superficie luminal. Los nematodos presentan dimorfismo sexual, siendo las hembras generalmente más grandes que los machos. El desarrollo de su larva pasa por cuatro etapas, cada una seguida por una muda de cutícula. La quinta etapa de su desarrollo corresponde al gusano adulto [Castro, 1996; Harvey *et al.*, 2007].

A pesar de ser un grupo complejo y heterogéneo de animales, todos los helmintos parásitos comparten una importante característica: son capaces de generar infecciones crónicas en sus hospederos naturales específicos [Wiria *et al.*, 2012]. Algunas de ellas forman parte de las llamadas Enfermedades Tropicales Desatendidas [Hotez *et al.*, 2011], las cuales afectan a la cuarta parte de la población mundial [Hotez *et al.*, 2008]. Generalmente, los helmintos parásitos se desarrollan en los aparatos digestivo, circulatorio, reproductor y en el sistema nervioso de sus hospederos [Hotez *et al.*, 2008], y muchos de ellos tienen complejos ciclos de vida que involucran varios hospederos. En hospederos mamíferos, los helmintos suelen crecer de forma extensa y diferenciarse produciendo estadíos que permiten su transmisión hacia el siguiente hospedero. En general, el estadio responsable de infectar mamíferos es la larva, la cual debe migrar hasta un nicho apropiado donde puede crecer y reproducirse. Debido a que requieren distintos hospederos para completar su ciclo, los helmintos parásitos deben alojarse en sitios anatómicos desde los cuales puedan salir luego [MacDonald *et al.*, 2002].

Desde una perspectiva evolutiva, cabe destacar que los helmintos parásitos han convivido e interactuado con el sistema inmune de sus hospedadores desde muy temprano en la historia, de forma tal que han logrado un equilibrio que favorece su establecimiento. Esta estrategia de asentamiento, mediante la evasión de las respuestas del sistema inmunitario y la reducción de síntomas y signos en los hospederos, favorece su supervivencia y posterior diseminación, siendo este su objetivo principal [Vuitton *et al.*, 2010].

1.2. Respuesta inmune frente a las infecciones por helmintos parásitos.

Los helmintos parásitos producen infecciones crónicas en hospederos inmunocompetentes, lo cual implica que poseen estrategias que les permiten adaptarse a los mecanismos de defensa de sus hospederos para así poder sobrevivir en su interior durante períodos de tiempo prolongados. Es así que en la mayoría de los casos, la respuesta inmune producida por el hospedero no es efectiva a la hora de eliminar al parásito. La cronicidad de la que hablamos en general se correlaciona con respuestas polarizadas de citoquinas. Generalmente, las infecciones por parásitos intracelulares se asocian a respuestas de citoquinas de tipo Th1; mientras que aunque los helmintos son un grupo de animales muy divergente, inducen respuestas estereotipadas de tipo Th2, con nulos o muy bajos niveles de componentes de tipo Th1 [Pearce *et al.*, 2004].

La respuesta inmune contra parásitos helmintos se caracteriza por la acción de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-10, así como por una marcada expansión de eosinófilos y mastocitos [Hotez *et al.*, 2010; Allen & Maizels, 2011]. A su vez, se producen niveles elevados de anticuerpos de todos los isotipos/subclases, pero especialmente de IgE, IgG1 e IgG4 en humanos [McSorley & Loukas, 2010; Caldas *et al.*, 2008; Wright & Bickle, 2005]. El papel de estos actores en la interacción hospedero-parásito se mantiene desconocido para muchas infecciones [Baz *et al.*, 2006]. A su vez, la resistencia a la infección y la eliminación de los helmintos no depende únicamente de un fenotipo celular particular o de un solo mecanismo molecular de eliminación, sino de múltiples vías de desarmado, degradación y dislocación ("*disable, degrade and dislocate*") del parásito, que en última instancia llevan a su expulsión [Zhang *et al.*, 2012].

Por un lado, las células innatas son las principales productoras de las citoquinas clave en las respuestas de tipo Th2 contra helmintos [Koyasu *et al.*, 2010; Neill & McKenzie, 2011]. Por otro lado, las citoquinas son factores importantes en la regulación del sistema inmune y se secretan en respuesta a diferentes estímulos (propios o foráneos). La comunicación entre células, tanto en un mismo sitio anatómico como a distancia ocurre vía citoquinas, las cuales determinan la calidad y la potencia de la respuesta inmune innata y adaptativa [Baz *et al.*, 2006]. La existencia de componentes parasitarios -principalmente glicoconjugados- capaces de sesgar la respuesta del hospedero hacia un perfil Th2 ha sido ampliamente descrita [Appelmelk

et al., 2003; Dai *et al.*, 2001; Anbu & Joshi, 2008; Hokke & Deelder, 2001; Sestak *et al.*, 2002; Atochina *et al.*, 2001; Terrazas *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2004; Everts *et al.*, 2009].

Los componentes adaptativos que participan en la respuesta contra helmintos son células Th2 efectoras y células T reguladoras, las cuales minimizan la patogenicidad pero, paradójicamente, pueden llegar a bloquear también la expulsión del parásito [Taylor *et al.*, 2012]. Las células B cumplen un papel dual, actuando tanto en detrimento [Harris & Gause, 2011] como a favor [Amu *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2010] de la inmunidad anti-parasitaria, según sea el caso.

Durante este tipo de respuestas, la IL-4 induce el cambio de clase en las células B activadas hacia la producción de IgE, la cual se une al FcεRI de mastocitos y basófilos. Su subsiguiente unión a su antígeno específico produce entrecruzamiento de los receptores, derivando en la degranulación de las mencionadas células y la liberación de mediadores inflamatorios como histamina, prostaglandinas y leucotrienos [Boyce, 2003]. A su vez, está reportado que los linfocitos B podrían llegar a sesgar la respuesta inmune hacia un perfil Th2 [Barr *et al.*, 2007; Macaulay *et al.*, 1997]. Interesantemente, se ha visto que la IL-10 secretada por células B CD5⁺ estimuladas por CpG a través del TLR-9, regula de forma negativa la respuesta pro-inflamatoria de las células dendríticas [Sun *et al.*, 2005].

Por lo anterior, es posible decir que los linfocitos B mediante la secreción de IL-10, podrían regular negativamente las respuestas de tipo Th1, reduciendo así las respuestas inflamatorias que dañarían tanto al parásito como a su hospedero, y también favoreciendo el desarrollo de respuestas de tipo Th2. Por ejemplo, en el caso de *S. mansoni*, se ha visto que el parásito induce la expansión de células B1 peritoneales y células B de bazo, y que además, oligosacáridos de antígenos de huevos promueven la proliferación B y secreción de IL-10 [Velupillai & Harn, 1994; Velupillai *et al.*, 1996]. Este hecho sugiere que estructuras parasitarias podrían modular la inflamación crónica mediante la inducción de IL-10 en células B [Harris & Gause, 2011].

1.3. *Echinococcus granulosus*: características biológicas y ciclo de vida.

Los parásitos del género *Echinococcus*, son un grupo de platelmintos cestodos causantes de variadas formas de equinococosis (quística, alveolar o poliquística). Desde el punto de vista taxonómico, este género está actualmente compuesto por 9 especies: *E. granulosus sensu stricto* (s.s.) (genotipos G1-3), *E. equinus* (genotipo G4), *E. ortleppi* (genotipo G5), *E. canadensis* (genotipos G6-10), *E. felidis* (“cepa león”), *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *E. oligarthrus*, y *E. shiquicus*. [Xiao *et al.*, 2005; Hüttner *et al.*, 2008; Thompson, 2008; Nakao *et al.*, 2010; 2013], siendo *E. granulosus* s.s. (particularmente el genotipo G1) el que presenta mayor distribución mundial y es responsable de aproximadamente el 80% de los casos humanos de equinococosis quística (en adelante: EQ) [Cucher *et al.*, 2015].

E. granulosus sensu lato (s.l.), complejo multi-especies compuesto por los 10 genotipos reconocidos, requiere de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo vital: un hospedero definitivo donde se desarrolla el gusano adulto (en el intestino delgado) y un hospedero intermediario en el cual se desarrolla el metacestode (en las vísceras) [Moro & Schantz, 2009]. El hospedero definitivo es siempre carnívoro (perro u otros cánidos), el cual se infecta al ingerir el estadio parasitario de protoscólex (en adelante PSC) resultante de la reproducción asexual del metacestode o quiste hidático. Un único quiste puede contener miles de PSC en su interior y cada uno de ellos tiene la capacidad de desarrollarse en un gusano adulto, normalmente de unos 3 mm de longitud. Este último produce huevos conteniendo al embrión (la oncósfera) que son expulsados a través de las heces del hospedero definitivo. Los huevos sobreviven en el ambiente por largos períodos de tiempo y son inefectivos para sus hospederos intermediarios (ungulados domésticos y salvajes) luego de la ingesta accidental por parte de los mismos [Thompson, 1995]. Una vez ingeridas las oncósferas, estas se activan en el intestino delgado del hospedero intermediario (herbívoro u omnívoro) y atraviesan la mucosa intestinal hacia el sistema circulatorio del hospedero (venoso y linfático) gracias a la producción de secreciones líticas. A partir de allí pasan principalmente a hígado y pulmones, y otros sitios óptimos para el desarrollo post-oncósfera. Días después, las oncósferas comienzan a desarrollarse en quistes, y la duración de este proceso varía según las distintas especies de hospederos intermediarios.

El metacestode es unilocular esférico y se mantiene distendido gracias a que contiene un líquido claro y transparente llamado líquido hidático. La pared del quiste se compone de dos capas: una externa y acelular, de estructura laminada y formada por mucopolisacáridos; y otra interna, la membrana germinativa, constituida por epitelio nucleado, capaz de proliferar originando agregados de células que se vacuolizan y generan las denominadas vesículas prolíferas. Asimismo, en el interior de éstas, por gemación se forman los PSC (cabezas de futuros gusanos). Con el tiempo, las vesículas se desprenden de la capa germinativa y flotan libremente en el interior del quiste (vesículas hijas); algunas se rompen y se liberan los PSC que se acumulan constituyendo la llamada arenilla hidática. El quiste queda recubierto por una capa de tejido conjuntivo (capa adventicia) resultante de la reacción inflamatoria del hospedero [Siracusano *et al.*, 2009].

En el humano (hospedero intermediario accidental), los quistes crecen lentamente, de 1 a 5 cm por año, pudiendo llegar a los 20 cm de diámetro en el hígado. Luego de un tiempo pueden formarse septos internos y quistes hijos que modifican el patrón unilocular característico de los quistes jóvenes. En el transcurso de su desarrollo pueden comprimir estructuras adyacentes, fisurarse, infectarse o romperse. De hecho, cuando un quiste fértil se rompe accidentalmente, se produce una siembra interna de PSC que, dada su plasticidad, pueden evolucionar a nuevos quistes en el hospedero intermediario o a gusanos adultos en el hospedero definitivo. A esta forma de infección se la llama equinocosis quística secundaria [Thompson, 1995].

1.4. Equinocosis quística.

De forma general, las equinocosis son un grupo de infecciones zoonóticas causadas por el estadio larval de cestodos pertenecientes al género *Echinococcus*. Originalmente se consideraba a *E. granulosus* como el único agente causante de EQ, pero actualmente se reconocen otras especies dentro del mismo taxón que son capaces de causar dicha patología [Nakao *et al.*, 2013]. Así, a medida que las diferentes variantes génicas o genotipos de *E. granulosus* (mencionados en el apartado anterior) se han ido identificando, se observó que cada una de ellas muestra diferencias en preferencia respecto al hospedero intermediario (por ejemplo: G1 en ovejas, G4 en caballos, G5 en vacas, etc.). Sin embargo, la discusión taxonómica de

las especies causantes de EQ continúa y aún estamos lejos de llegar a un acuerdo final [Lymbery *et al.*, 2015].

La cuestión taxonómica es de gran relevancia, ya que distintas especies del género *Echinococcus* causan distintos tipos de equinocosis en humanos. Así, mientras la EQ es causada por infecciones con *E. granulosus* s.s., *E. ortleppi* y *E. canadensis*; la equinocosis alveolar es causada por *E. multilocularis*; y la equinocosis poliquística por *E. vogeli* y *E. oligarthrus*. Hasta el momento, no se han reportado casos de equinocosis humana debido a *E. equinus*, *E. felidis* o *E. shiquicus* [Álvarez-Rojas *et al.*, 2014].

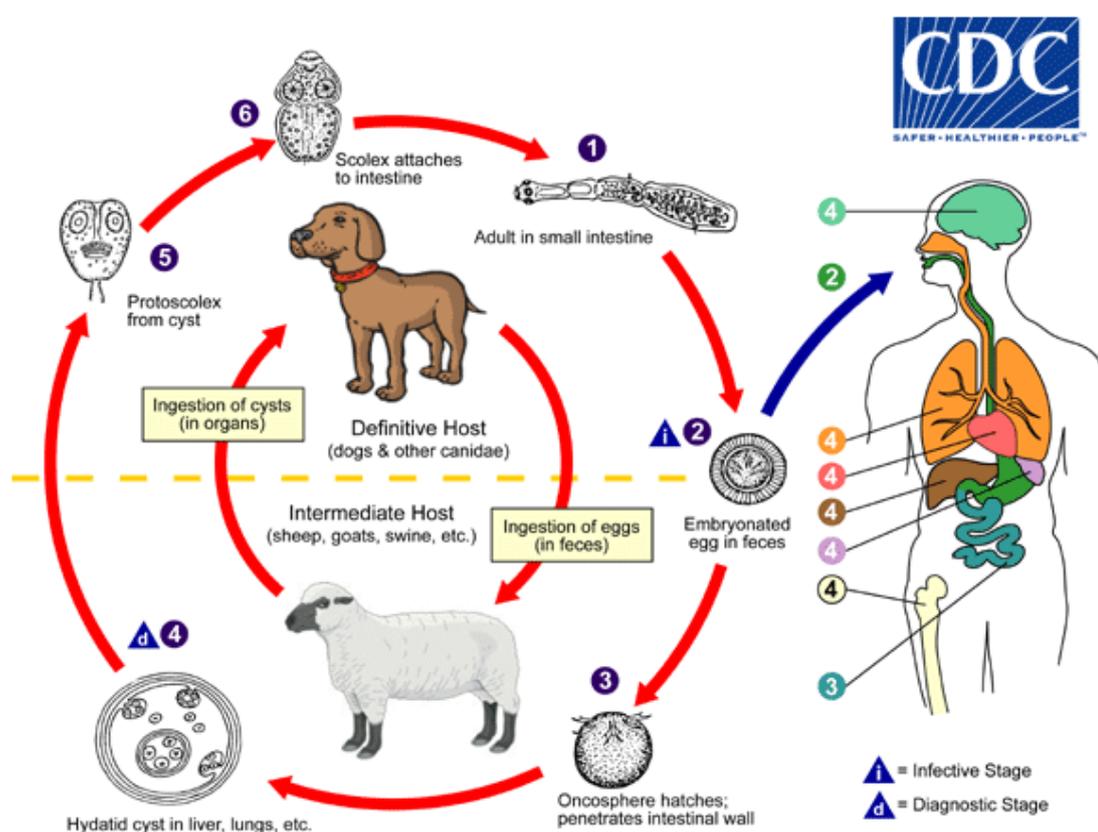


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus sensu lato*. Extraído de <https://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html>.

La identificación regional de las cepas/genotipos circulantes de *E. granulosus* es relevante para la salud pública por distintos motivos. Por ejemplo, la forma adulta del

parásito de las cepas G2, G5 y G6 posee un tiempo de maduración más corto y esto lleva a que el intervalo para la administración de medicamentos para tratar perros infectados deba ser menor en las zonas donde dichas cepas son predominantes [Rosenzvit *et al.*, 1999]. A su vez, ciertas actividades humanas (por ejemplo, alimentar perros con vísceras crudas de ovejas) posibilitan la transmisión de la cepa G1 y por consiguiente, elevan el riesgo de infecciones humanas [Moro *et al.*, 2008].

La EQ presenta una prevalencia mundial aproximada de 6 millones de humanos infectados [Siracusano *et al.*, 2009; Thompson, 2008; Moro & Schantz, 2009] y actualmente integra, según la Organización Mundial de la Salud, el grupo de patologías infecciosas denominado Enfermedades Tropicales Desatendidas [Cucher *et al.*, 2015]. Las pérdidas socio-económicas mundiales anuales asociadas a esta enfermedad están estimadas entre 1 y 3.6 millones de DALYs (del inglés *Disability-Adjusted Life Year*) para el caso de humanos [Craig *et al.*, 2007], y 2 billones de dólares americanos para el caso de la industria ganadera [Budke *et al.*, 2006]. La dimensión de dichas pérdidas se debe en parte a que la EQ es una zoonosis cosmopolita, siendo especialmente endémica en gran parte del oeste de China y en Asia central, en los países con costas sobre el mar Mediterráneo, en el sur de Brasil, en las regiones montañosas de Perú, en el cono sur de América del Sur (Argentina, Chile y Uruguay), en Australia y en partes del cuerno de África [Yang *et al.*, 2006; Moro *et al.*, 2008; Cucher *et al.*, 2015].

Respecto a la respuesta inmune del hospedero, aunque la estrategia de eliminación “*disable, degrade and dislocate*” resulta efectiva para muchas infecciones por helmintos, en el caso de la EQ, una vez que se establece el quiste, este ya no puede ser eliminado por el sistema inmune [Zhang *et al.*, 2012]. Para el caso de la EQ en humanos, se ha propuesto que las respuestas de citoquinas se correlacionarían con los estadios crónicos de la infección [Amri *et al.*, 2009]. A su vez, está reportado que anticuerpos específicos contra antígenos de oncósferas participarían en la eliminación del parásito y serían centrales en la respuesta inmune protectora [Dempster *et al.*, 1992]. A pesar de que los niveles de dichos anticuerpos son bajos en etapas tempranas de la infección [Zhang *et al.*, 2003], se ha visto que las reacciones de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos sería uno de los mecanismos involucrados en la eliminación del parásito [Beardsell & Howell, 1984; Rogan *et al.*, 1992]. En la fase crónica de la infección en humanos, frecuentemente se encuentran niveles elevados de anticuerpos, particularmente IgG, IgM e IgE [Dessaint *et al.*, 1975; Craig, 1986; Pinon *et al.*, 1987; Daeki *et al.*, 2000; Khabiri *et al.*, 2006], siendo IgG1 e

IgG4 las subclases mayoritarias [Aceti *et al.*, 1993; Wen & Craig, 1994; Ioppolo *et al.*, 1996; Shambesh *et al.*, 1997; Sterla *et al.*, 1999; Daeki *et al.*, 2000]. Aun así, en un 30-40% de los pacientes con EQ no se observan niveles detectables de anticuerpos contra antígenos de líquido hidático, si bien en suero de muchos de ellos se pueden detectar niveles variables de inmunocomplejos circulantes. Estos últimos podrían regular e inhibir la activación y proliferación de células B, directamente sobre ellas o bien mediante mecanismos T reguladores [Zhang *et al.*, 2012]. En este sentido, existe un antígeno lipoproteico llamado antígeno B (AgB), presente en grandes cantidades en el líquido hidático, que ha mostrado importantes propiedades inmunomoduladoras [Riganò *et al.*, 2001; Mamuti *et al.*, 2006].

El espectro clínico de la EQ en humanos va desde infecciones asintomáticas a severas, y raramente fatales. Actualmente existen cuatro aproximaciones para el manejo clínico de la enfermedad: en el caso de quistes activos las opciones son cirugía, técnicas percutáneas y/o quimioterapia, mientras que para quistes inactivos lo usual es el seguimiento continuo de su evolución. Para decidir cuál aproximación utilizar en cada paciente se toman en cuenta el estadio del quiste, su tamaño y localización anatómica, y las co-morbilidades potencialmente asociadas [Brunetti & Junghanss, 2009; Piccoli *et al.*, 2014; Rinaldi *et al.*, 2014].

El diagnóstico y seguimiento de la EQ en humanos se basa mayoritariamente en el uso de técnicas imagenológicas, principalmente ultrasonido, la cual ha permitido clasificar de forma estandarizada a los quistes hidáticos según su “estado vital” (activos: CE1, CE2, CE3a; transicionales: CE3b; inactivos: CE4 y CE5). Dicha clasificación es útil desde el punto de vista clínico al momento de elegir la mejor alternativa terapéutica para el paciente [Brunetti *et al.*, 2010; 2016]. Por su parte, los métodos serológicos utilizados en diagnóstico y seguimiento consisten básicamente en la detección de anticuerpos IgG específicos contra antígenos del líquido hidático, mayoritariamente AgB. Sin embargo, varias desventajas en su uso han sido reportadas debido a su moderada o baja sensibilidad y especificidad diagnósticas, y a su pobre valor pronóstico durante el seguimiento post-quirúrgico, a causa de que dichos anticuerpos perduran por largos períodos de tiempo en circulación [Manzano-Román *et al.*, 2015]. A su vez, los niveles de IgGs específicas cambian con el número, el tamaño, la localización y el “estado vital” de los quistes [Lissandrin *et al.*, 2016], haciendo que solamente un 60-80% de los casos de EQ en humanos confirmados por cirugía muestren serología positiva [Craig, 1997]. A pesar de ello, los niveles de subclases de IgG específicas contra AgB son buenos marcadores del estado de la

infección, ya que títulos elevados de IgG4 se asocian a fases evolutivas de la EQ (quistes tipo CE1, CE2 y CE3a-CE3b), mientras que títulos elevados de IgG1, IgG2 e IgG3 se correlacionan con fases involutivas de la enfermedad (quistes tipo CE4 y CE5) [Daeki *et al.*, 2000]. Asimismo, se ha reportado que individuos con infección primaria presentan niveles menores de IgE e IgG4 específicas contra líquido hidático comparado con pacientes con recidivas [Riganò *et al.* 1995a; 1995b; 1996; Hernández-Pomi *et al.* 1997]. De esta manera, podría pensarse que la calidad de la respuesta humoral de pacientes con EQ, en términos de isotipos y subclases de anticuerpos inducidas, podría condicionar el desarrollo de la infección.

Por último, cabe destacar que la práctica de referencia para el tratamiento de la enfermedad es la remoción quirúrgica del/los quiste/s hidático/s. Sin embargo, la misma posee un problema grave asociado al procedimiento: la EQ secundaria. De hecho, el porcentaje de casos post-quirúrgicos de EQ secundaria oscila entre 10% y 31%, dependiendo de la serie en estudio y el tiempo de seguimiento [Schiller, 1966; Mottaghian & Saidi, 1978; Morel *et al.*, 1988; Little *et al.*, 1988; Teggi *et al.*, 1993; Saimot, 2001].

1.5. Modelo murino de equinocosis quística secundaria.

En forma similar a lo que ocurre con otras infecciones por cestodos, la hidatidosis desencadena una respuesta en el hospedero que generalmente no se asocia con inmunidad protectora. Por ende, es posible asumir que el parásito posee estrategias de evasión y/o modulación de la respuesta inmune de su hospedero. En este sentido, se han propuesto algunos mecanismos gracias a estudios realizados sobre el modelo murino de EQ secundaria. El mismo consiste en la inoculación por vía intraperitoneal (i.p.) de PSC viables en ratones inmunocompetentes, y se basa en la capacidad de aquellos de diferenciarse a quistes hidáticos en hospederos intermediarios [Heath, 1970]. Este modelo ha ganado terreno sobre otros, principalmente el de infección primaria, ya que permite utilizar estadios parasitarios no infectivos para los seres humanos, lo que permite trabajar bajo condiciones de bioseguridad menos estrictas.

La cepa de ratones Balb/c ha sido la más utilizada en el modelo de EQ secundaria, y es a partir de ella que se ha obtenido la mayor parte de la información actualmente disponible. En ella, la EQ secundaria se desarrolla en dos etapas: una etapa temprana

(pre-enquistamiento) que dura hasta el día 20-30 post-inoculación (p.i.), durante la cual los PSC se diferencian a quistes [Richards *et al.*, 1983]; seguida de una etapa tardía (post-enquistamiento) en la cual los quistes ya establecidos aumentan de tamaño, y eventualmente se vuelven fértiles [Rogan *et al.*, 2015].

Son escasos los reportes existentes respecto a las primeras etapas del establecimiento de la infección experimental, es decir, la diferenciación de los PSC a quistes en la cavidad peritoneal de ratones infectados. Por ejemplo, se ha visto que los PSC inoculados son encapsulados muy rápidamente (7 días p.i.) dando lugar a la formación de pequeños granulomas en ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y diafragma [Riley *et al.*, 1984]. Más recientemente, se reportó que hacia el día 100 p.i., el 2-3% de los PSC inoculados se encuentran completamente diferenciados en quistes viables [Breijo *et al.*, 1998], mientras que la inflamación local se resuelve y desaparece completamente sobre el día 30 p.i. [Breijo *et al.*, 2008]. Estos hallazgos indicarían que el establecimiento y la sobrevivencia del parásito en la infección secundaria experimental, se correlacionan con un fuerte control local de la inflamación al inicio de la diferenciación del PSC a quiste.

Por otra parte, los primeros reportes sobre la respuesta humoral en el modelo mostraron que existen variaciones cuanti-cualitativas en la producción de anticuerpos según el estadio específico del parásito [Araj *et al.*, 1977; Liu *et al.*, 1992; Haralabidis *et al.*, 1995]. Asimismo, se ha visto que la respuesta de anticuerpos contra el líquido hidático reconoce principalmente epítopes glucídicos y que, en la fase crónica de la infección, no sufre maduración de su avidéz [Ferragut & Nieto, 1996]. Seguidamente, se observó que la relación de títulos IgG1/IgG3 específicos contra antígenos somáticos de PSC (PSA, del inglés: *Protoscolex Somatic Antigens*), así como la avidéz de las IgG3 específicas y el reconocimiento de epítopes peptídicos, decrecen a lo largo del tiempo [Severi *et al.*, 1997]. Por su parte, en lo referido a la etapa temprana de la infección experimental, se ha reportado que ratones Balb/c con 1 semana de infección, producen anticuerpos IgM e IgG específicos contra PSA a nivel sistémico [Dematteis *et al.*, 1999] y los mismos serían producto de respuestas, en su mayoría, T-independientes dirigidas principalmente contra epítopes glucídicos [Baz *et al.*, 1999; 2008]. Más recientemente, se reportó que las poblaciones linfocitarias peritoneales poseen una cinética diferente en su comportamiento. En particular, se observó que se produce un descenso significativo en el número de células B (CD19⁺) peritoneales muy rápidamente (día 5 p.i.) acompañado por una activa diferenciación de linfocitos B a células productoras de anticuerpos que secretan IgM e IgG2b específicos contra PSA

[Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a]. Esta respuesta podría ser relevante para evitar el establecimiento de la infección, ya que (al menos *in vitro*) los PSC son altamente sensibles a la activación del sistema del complemento por vía clásica [Ferreira *et al.*, 1992].

Con respecto a la respuesta de citoquinas, uno de los primeros trabajos en el área mostró que en el suero de ratones Balb/c en etapa crónica de infección se detectan citoquinas tanto del tipo Th1 como del tipo Th2 [Haralabidis *et al.*, 1995]. En este sentido, los helmintos parásitos se caracterizan por inducir potentes respuestas de tipo Th2, tanto en modelos murinos como también en humanos [Díaz & Allen, 2007; Jenkins & Allen, 2010]. Sin embargo, de forma análoga a lo que ocurre en humanos, la inmunidad contra *E. granulosus* en ratones infectados dependería de efectores típicos de respuestas de tipo Th1 [Rogan, 1998; Dematteis *et al.*, 1999, 2003; Al-Qaoud & Abdel-Hafez, 2008; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a]. En 1998, Micheal Rogan analizó el perfil de citoquinas producidas por células de bazo de ratones Balb/c con 3 meses de infección [Rogan, 1998]. Mediante experimentos *in vitro* de cultivo de esplenocitos re-estimulados con líquido hidático, observó que dicho perfil se compone de una gran producción de IL-10 e IL-4, y niveles muy bajos de IFN- γ . Además, en ratones con 5 meses de infección, se observó que las células que rodean al quiste producen mayoritariamente IL-10. A su vez, se analizó el perfil de citoquinas en ratones a los que se les implantó quistes viables mediante cirugía, y se observó que 2 semanas luego de la implantación, todos ellos continuaban siendo viables y los esplenocitos y las células que los rodeaban secretaban altos niveles de IL-10. Mientras tanto, el mismo análisis pero a los 4 meses post-implantación mostró que los ratones con quistes no viables produjeron cantidades elevadas de IFN- γ , contrariamente, los ratones con quistes viables mostraron niveles reducidos de IFN- γ . A partir de estos resultados, Rogan postuló que el parásito induciría respuestas de citoquinas de tipo Th2 como forma de inhibir la producción de citoquinas de tipo Th1 potencialmente perjudiciales para sí mismo [Rogan, 1998].

Por otro lado, se reportó que en la etapa temprana de la infección secundaria en ratones Balb/c (antes del día 20 p.i.) la respuesta de citoquinas a nivel sistémico es claramente de tipo Th2 [Dematteis *et al.*, 1999]. La estimulación *in vitro* con PSA, de esplenocitos obtenidos de ratones con 1-3 semanas de infección, induce niveles significativos de IL-4, IL-5 e IL-10, sin la detección de importantes cantidades de IFN- γ . Es claro que esta respuesta no posee relación con mecanismos protectores, ya que de todas formas la infección logra establecerse [Dematteis *et al.*, 1999]. En línea con lo

anterior, Dematteis y cols. mostraron luego que células peritoneales adherentes de ratones Balb/c vírgenes activadas con IFN- γ presentan *in vitro* actividad protoscolicida [Dematteis *et al.*, 2003]. Más recientemente, Mourglia-Ettlin y cols. reportaron que en ratones Balb/c infectados, la expresión temprana de citoquinas a nivel local experimenta una cinética bifásica que se caracteriza por la inducción inicial de citoquinas de tipo Th1 seguida de un cambio, al día 5 p.i. aprox., hacia un perfil de tipo Th2. Es importante destacar que durante el periodo de infección analizado en este trabajo (hasta el día 9 p.i.), no se observó un aumento de la expresión de IL-12 y por tanto se propone que el mencionado comportamiento, junto al no aumento de los niveles de IL-12, indicaría que *E. granulosus* sería capaz de modular la respuesta de citoquinas hacia un perfil de tipo-Th2 para favorecer su sobrevivencia [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a]. Estos y otros resultados [Al-Qaoud & Abdel-Hafez, 2008; Riganò *et al.*, 1999a; 1999b], apoyan la hipótesis de que el IFN- γ (citoquina clave en las respuestas de tipo Th1) jugaría un rol central en la eliminación del parásito. Así, el desarrollo temprano de una respuesta de citoquinas de tipo Th2 podría interpretarse como un mecanismo inducido y/o modulado activamente por el parásito propiciando su sobrevivencia.

Como se comentó, la información presentada previamente ha sido obtenida principalmente en base al uso de ratones de la cepa Balb/c como modelo de estudio. Sin embargo, se sabe que el perfil de la respuesta inmune del hospedero depende -al menos parcialmente- de sus características genéticas. En este sentido, son varios y variados los estudios que muestran diferencias en las respuestas inmunes adaptativas desarrolladas por ratones de las cepas Balb/c y C57Bl/6, polarizándolas hacia perfiles del tipo Th2 y Th1, respectivamente. Sin embargo, los fenómenos de resistencia o susceptibilidad de cada una de dichas cepas a infecciones por helmintos, ha mostrado ser patógeno-específica [Hoffmann *et al.*, 2000; Terrazas, 2008; Filbey *et al.*, 2014].

En este sentido, nuestro grupo reportó recientemente que ambas cepas de ratones poseen distinta susceptibilidad a la EQ secundaria: los ratones Balb/c son más susceptibles que los C57Bl/6 [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a]. Así, se profundizó en la búsqueda de mecanismos que ayuden a explicar dicha diferencia y se observó que ambas cepas desarrollan distintos perfiles de respuestas tempranas y locales de citoquinas. Globalmente, se reportó que -a diferencia de los ratones Balb/c- los ratones C57Bl/6 desarrollan respuestas mezcladas de IL-5/TNF- α en concomitancia con respuestas de tipo Th2 de baja intensidad. Asimismo, exhiben infiltrados peritoneales ricos en macrófagos y células B, pero pobres en eosinófilos. Por último, se vio también

que las diferencias mencionadas a nivel local, en ratones C57Bl/6, se correlacionan con una mayor producción de óxido nítrico y con una mayor actividad anti-parasitaria *in vitro* de sus células peritoneales (actuando en forma directa o mediante mecanismos de ADCC, del inglés *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]. Estos resultados sugerirían entonces que respuestas de tipo Th2 de baja intensidad en concomitancia con mecanismos celulares activos asociados a respuestas de tipo Th1, serían determinantes de la susceptibilidad del hospedero intermediario experimental frente a la EQ secundaria.

Por otro lado, las cepas de ratones Balb/c y C57Bl/6 poseen distintos haplotipos de moléculas del MHC-II, lo cual podría provocar una presentación diferencial de antígenos que influyera sobre el espectro de especificidades de los anticuerpos inducidos en cada una. En este sentido, nuestro grupo reportó la existencia de diferencias entre cepas en cuanto a los niveles de anticuerpos específicos -naturales e inducidos- contra el parásito [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]. Así, se observó que niveles mayores de IgG2b naturales se correlacionan con un menor número de quistes desarrollados y una menor carga parasitaria, e interesantemente dichos anticuerpos están significativamente elevados en los ratones de la cepa C57Bl/6. Por otro lado, se observó que los ratones Balb/c infectados exhiben una polarización temprana de anticuerpos inducidos hacia IgG1 de alta avidéz, mientras que los C57Bl/6 muestran una respuesta con predominancia de IgM/IgG2c/IgG2b; sugiriéndose así que las respuestas polarizadas hacia IgG1 se relacionarían con susceptibilidad a la EQ secundaria [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a]. Estos resultados son de gran interés ya que IgM, IgG2c e IgG2b son isotipos/subclases de anticuerpos con excelente capacidad activadora del sistema complemento [Nimmerjahn & Ravetch, 2005; 2006], el cual posee actividad protoscolicida [Ferreira *et al.*, 1992]. Estos reportes sugieren que los anticuerpos (naturales e inducidos) jugarían un papel importante en la susceptibilidad del hospedero experimental frente a infección por *E. granulosus*. Queda claro entonces que estas diferencias en susceptibilidad han sido útiles a la hora de descifrar cuáles serían los mecanismos inmunes efectores óptimos para el hospedero experimental frente al desarrollo de la EQ.

Por último, creemos importante destacar que el establecimiento de la EQ en humanos es generalmente un proceso asintomático, y que por lo tanto, resulta prácticamente imposible estudiar la respuesta inmune temprana contra *E. granulosus* en contextos naturales de infección humana. En este sentido, si bien el modelo de la EQ secundaria tiene sus limitaciones, ya que por ejemplo al utilizar ratones vírgenes

no quedan reflejados los posibles efectos que tendría la infección primaria original, igualmente resulta de gran ayuda para la interpretación de los procesos inmunológicos que ocurren en la etapa crónica de la infección, y para proponer posibles hipótesis referidas a los eventos que ocurrirían en las etapas tempranas de la misma [Tamarozzi *et al.*, 2016].

1.6. Superfamilia de receptores *scavengers* ricos en cisteína: estructura, distribución y funciones.

Los receptores *scavenger* (en adelante RSs) se definieron originalmente por su capacidad de interactuar con lipoproteínas modificadas. Sin embargo, actualmente se sabe que presentan una mayor gama de ligandos, tanto de origen microbiano como endógeno. Estos comparten como característica, su naturaleza polianiónica, y por lo tanto, hoy en día el término RS define a aquellas glicoproteínas (solubles o unidas a membrana) involucradas en la endocitosis y/o el reconocimiento de moléculas con carga negativa [Sarrias *et al.*, 2004].

La superfamilia de receptores *scavengers* ricos en cisteína (SF-SRCRs, del inglés *Scavenger Receptors Cysteine-Rich*) se describió a comienzos de 1990, luego de que se identificaran varios receptores que poseían al menos un dominio homólogo al presente en el extremo C-terminal del RS denominado SR-AI en macrófagos [Freeman *et al.*, 1990]. El hecho que algunos miembros de la SF-SRCR tengan funciones de tipo RSs ha causado cierto nivel de confusión entre ambas familias de receptores innatos, por lo que es preciso aclarar ambos conceptos. Desde el punto de vista estructural, no se ha podido identificar un dominio común encargado de la actividad *scavenger*, por lo que los RSs constituyen una familia funcional de receptores estructuralmente no relacionados [Gough & Gordon, 2000]. Por su parte, los miembros de la SF-SRCRs están estructuralmente muy relacionados pero comparten muy pocas funciones. El modelo actual plantea que los dominios SRCR intervendrían en interacciones de tipo proteína-proteína, tanto homo- como hetero-típicas [Bowdish & Gordon, 2009]. A su vez, existe clara evidencia sobre la capacidad de algunos miembros de la superfamilia para reconocer PAMPs (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) [Bikker *et al.*, 2004; Brännström *et al.*, 2002; Sarrias *et al.*, 2005; 2007; Fabrick *et al.*, 2009; Vera *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2014; Sanjuro *et al.*, 2015]. Además, algunos miembros han sido involucrados en el desarrollo del sistema inmune y la regulación de

respuestas inmunes innatas y adaptativas [Aruffo *et al.*, 1997; Chappell *et al.*, 2015; Sanjurjo *et al.*, 2015].

Actualmente, la SF-SRCR está compuesta por más de 30 miembros -de membrana y/o secretados- descritos en diversos mamíferos, así como en distintas especies filogenéticamente muy distantes, lo que la convierte en una superfamilia muy antigua y altamente conservada [Martínez *et al.*, 2011]. En cuanto a la estructura, los dominios SRCRs se componen de 90-110 aminoácidos, destacándose su alto y bien definido contenido de cisteínas (Cys) [Sarrias *et al.*, 2004]. A su vez, los dominios SRCRs pueden clasificarse en 2 tipos: los dominios tipo A y los dominios tipo B. Los primeros están codificados por al menos 2 exones y contienen 6 residuos de Cys, y los segundos están codificados por un único exón y contienen 8 residuos de Cys. La posición relativa residuos es constante, definiéndose un patrón de enlaces disulfuro del tipo Cys2-Cys7, Cys3-Cys8 y Cys5-Cys6; y para los dominios tipo B además se observa Cys1-Cys4. Cabe mencionar que hasta el momento no se ha reportado la coexistencia de ambos tipos de dominios en una misma proteína [Resnick *et al.*, 1996].

1.7. Receptores CD5 y CD6: estructura, distribución y funciones.

Los receptores CD5 y CD6 son glicoproteínas de membrana de 67 kDa y 105-130 kDa, respectivamente. Presentan gran homología estructural y funcional, así como similitudes en sus perfiles de expresión. De hecho, ambas proteínas están codificadas por genes contiguos ubicados en la misma región cromosómica (cromosoma 11q22 en humanos y cromosoma 9 en ratones), lo cual podría deberse a fenómenos de duplicación génica partiendo de un ancestro común [Lecomte *et al.*, 1996; Padilla *et al.*, 2000]. Ambos receptores poseen regiones extracelulares (ectodominios) compuestas exclusivamente por 3 dominios SRCRs de tipo B en serie, una región transmembrana y una cola citoplasmática encargada de mediar procesos de señalización intracelular [Sarrias *et al.*, 2004].

Ambos receptores se expresan en timocitos desde etapas tempranas de su maduración, en linfocitos T maduros y en linfocitos B1a [Kamoun *et al.*, 1981; Martínez *et al.*, 2011]. Además, se ha descrito que CD6 (pero no CD5) se expresa también en algunas regiones del cerebro [Mayer *et al.*, 1990] y en sub-poblaciones de células NK [Zimmerman *et al.*, 2006]. Tanto CD5 como CD6 están asociados físicamente al TCR

(en células T) o al BCR (en células B1a) [Beyers *et al.*, 1992; Lankester *et al.*, 1994]. En linfocitos T, ambas proteínas junto a otras moléculas co-estimuladoras, componen un complejo macromolecular [Carmo *et al.*, 1999]. Por otro lado, está descrito que la molécula CD6 es capaz de asociarse físicamente en forma independiente al receptor CD5 [Gimferrer *et al.*, 2003] y al TCR/CD3 [Gimferrer *et al.*, 2004]. Estos hechos sugieren que ambos receptores se encuentran en buena posición para regular señales inducidas mediante el reconocimiento específico de antígenos, dependiendo del tipo y del estado de maduración celular. En este sentido, se postula que CD5 actuaría como molécula co-estimuladora en linfocitos T maduros, y como molécula de señalización negativa en timocitos y células B1a [Tarakhovsky *et al.*, 1995; Bikah *et al.*, 1996; Lozano *et al.*, 2000]. En línea con estos postulados, resultados obtenidos utilizando ratones transgénicos que expresan constitutivamente una forma soluble del ectodominio de CD5 humano (ratones shCD5E μ Tg) mostraron que los mismos desarrollan respuestas más fuertes contra auto-antígenos: específicamente manifiestan mejores respuestas anti-tumorales y formas más severas de autoinmunidad. Estos hechos se correlacionarían con una menor proporción de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ tanto en bazo como en ganglios linfáticos, y con una disminución en el número de células B productoras de IL-10 en cavidad peritoneal. Así, la interacción de CD5 con su(s) ligando(s) cumpliría un importante rol en la regulación de la respuesta inmune contra auto-antígenos y en la homeostasis de ciertas subpoblaciones linfocitarias [Fenutría *et al.*, 2014].

1.8. CD5 y CD6 como receptores de reconocimiento de patógenos.

Como se comentó previamente, existe clara evidencia sobre la capacidad de reconocer PAMPs por parte de algunos miembros pertenecientes a la SF-SRCR [Brännström *et al.*, 2002; Bikker *et al.*, 2004; Sarrias *et al.*, 2005; Fabrick *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2014; Sanjuro *et al.*, 2015]. En este sentido, se describió que los ectodominios de CD5 y CD6 interactúan también y en forma directa con PAMPs presentes en hongos y bacterias, respectivamente [Sarrias *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2009]. Así, los dominios extracelulares de CD5 (pero no los de CD6) son capaces de interactuar con motivos de β -glucanos de las paredes de hongos, con una afinidad equivalente a la reportada para *Dectin-1* (el principal receptor mamífero para β -glucanos) [Vera *et al.*, 2009]. Por otro lado, la región extracelular de CD6 (pero no la

de CD5) es capaz de unir LPS de bacterias Gram (-) y ácido lipoteicoico y peptidoglicanos de bacterias Gram (+). Lo destacable es que la afinidad de la interacción CD6-LPS es equivalente a la reportada para CD14, el principal receptor de LPS en mamíferos [Sarrias *et al.*, 2007]. Tanto la región extracelular de CD5 como la de CD6 son capaces de inducir agregación microbiana (fúngica y bacteriana, respectivamente), hecho que podría ser relevante en la prevención del tránsito de patógenos microbianos a través de barreras epiteliales y que además facilitaría su eliminación de la circulación por parte de las células fagocíticas. Por último, los estudios anteriores demostraron que las estructuras microbianas mencionadas también se unen a los receptores de membrana CD5 y CD6, e inducen señales de activación, vía MAPK, que permiten a los linfocitos la detección de una amplia gama de patógenos [Sarrias *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2009]. En este sentido, aunque aún no existen reportes al respecto, se podría suponer que la interacción de CD5 y CD6 con sus ligandos microbianos generaría efectos trascendentes en la expansión y función de linfocitos T y B1a, mediante modulación o interferencia de la señalización antígeno-específica vía TCR o BCR, según sea el caso. De hecho, este tipo de fenómenos ya ha sido reportado para otros PRRs de linfocitos, en particular para receptores de tipo TLRs [Caron *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Lampropoulou *et al.*, 2008, Yanaba *et al.*, 2009].

Por otro lado, existe evidencia sobre la relevancia práctica que tiene la capacidad de CD5 y CD6 de reconocer agentes microbianos: la administración de sus ectodominios recombinantes solubles -rshCD5 y rshCD6- tiene efectos beneficiosos en modelos murinos de shock séptico inducidos por PAMPs fúngicos (zymosán) o bacterianos (LPS, peptidoglicano, ácido lipoteicoico), respectivamente. Se ha visto que dichas administraciones aumentan el porcentaje de supervivencia y reducen los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 β , TNF- α) a la vez que se observan aumentos de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β) [Sarrias *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2009; Martínez-Florensa *et al.*, 2014]. Estos resultados pre-clínicos promueven el planteamiento del uso profiláctico o terapéutico de rshCD5 y rshCD6 en humanos con cuadros de sepsis.

Por último, parecería ser que tanto CD5 como CD6 son capaces además de reconocer virus. Así, CD5 actuaría como receptor de entrada del virus de la hepatitis C (HCV) en linfocitos T [Sarhan *et al.*, 2012] y existen resultados preliminares sobre la interacción de CD6 con la proteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) [Carrasco *et al.*, 2014]. Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente,

cabe la posibilidad de que las propiedades de reconocimiento de antígenos microbianos por parte de CD5 y CD6 se extiendan a otros patógenos, como sería el caso de parásitos.

1.9. Contexto y punto de partida.

Considerando que la gama de patógenos reconocidos por los receptores CD5 y CD6 es amplia, y que la misma podría extenderse aún más, nuestro grupo en colaboración reciente con el grupo “*Inmunoreceptores del Sistema Innato y Adaptativo*” dirigido por el Dr. Francisco Lozano de la Universidad de Barcelona (España), realizó varios y variados estudios que han mostrado la capacidad que tienen ambos receptores de reconocer e interactuar con antígenos de *E. granulosus*.

En primer lugar, mediante ensayos de tipo ELISA y *western blot* se observó que los ectodominios de CD5 y CD6 son capaces de interactuar con antígenos de PSC, particularmente con aquellos presentes en su tegumento (extracto antigénico denominado PSEx) y de naturaleza proteica y/o lipídica. Cabe agregar que, si bien se ha observado cierto solapamiento en el patrón de reconocimiento de PSEx por parte de rshCD5 y rshCD6, también se han evidenciado ciertas preferencias individuales. Así, mediante una estrategia de 2D-PAGE, *western blot* y MALDI-TOF/TOF, nuestro grupo logró identificar tres posibles ligandos proteicos presentes en PSEx: la tiorredoxina peroxidasa para rshCD5; y la peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ciclofilina) y la endofilina B1 (antígeno P-29) para rshCD6. Por otro lado, los resultados *in vitro* de interacción de rshCD5 y rshCD6 obtenidos con PSEx, se confirmaron realizando ensayos de unión a la superficie del parásito utilizando PSC viables e íntegros. Además, es importante mencionar que las concentraciones a las cuales los dos receptores interactúan con los antígenos parasitarios se encuentran dentro de rangos fisiológicos, descartándose posibles efectos artefactuales [Mourglia-Ettlin *et al.*, manuscrito en preparación].

En segundo lugar, también se demostró que las formas de membrana, tanto de CD5 como de CD6, son capaces de unir PSEx de forma específica y dependiente de la concentración. Sumado a esto, y queriendo evaluar la relevancia del reconocimiento mencionado, los autores analizaron los efectos de la interacción de PSEx con los receptores sobre la producción de citoquinas. En este sentido, observaron que dicha

interacción modula la producción de citoquinas, destacándose el hecho de que el bloqueo con rshCD5 produce el aumento de secreción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-6) sin aumento en la secreción de IL-10, mientras que el bloqueo mediante rshCD6 genera un descenso en la producción de las tres citoquinas mencionadas [Mourglia-Ettlin *et al.*, manuscrito en preparación].

Por último, se exploró el posible uso profiláctico de los ectodominios recombinantes de CD5 y CD6 en el modelo murino de EQ secundaria en ratones Balb/c (alta susceptibilidad a la infección). En este sentido, se observó que la administración i.p. de rshCD5 y -en menor medida- de rshCD6 previo al desafío de los ratones con PSC viables, induce efectos protectores en los animales; es decir, no desarrollan quistes o si lo hacen, alcanzan menores números que en los grupos control. Por lo tanto, en forma análoga a lo observado en modelos de shock séptico por PAMPs fúngicos o bacterianos, las formas rshCD5 y rshCD6 poseen un interesante potencial profiláctico en el modelo murino de EQ secundaria [Mourglia-Ettlin *et al.*, manuscrito en preparación].

Los resultados obtenidos hasta el momento son relevantes en sí mismos por varios motivos. Por un lado, existen escasos receptores innatos descritos con capacidad de reconocer antígenos parasitarios de helmintos [Paveley *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2013; Tundup *et al.*, 2015; Ponichtera & Stadecker, 2015; Aldridge & O'Neill, 2016]. Por otro lado, los receptores CD5 y CD6 se expresan en la subpoblación de linfocitos B1a que se localizan preferentemente en cavidades serosas como la cavidad peritoneal [Fainboim & Geffner, 2011], y que han sido sugeridos como actores celulares clave en el desarrollo de infecciones por helmintos al producir anticuerpos naturales poli-reactivos y actuar como células B con funciones reguladoras (Breg productoras de IL-10) [Fainboim & Geffner, 2011; Sun *et al.*, 2005; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b]. Por último, se ha reportado que los ratones de las cepas Balb/c y C57Bl/6 presentan diferencias en el número de células B1a peritoneales [Itakura *et al.*, 2013]. Todo ello permitiría sugerir que los receptores CD5 y/o CD6 podrían jugar papeles importantes en el normal desarrollo de la EQ murina.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1. Hipótesis de trabajo.

Los **receptores** linfocitarios CD5 y CD6 jugarían un papel relevante durante la etapa temprana del modelo murino de EQ secundaria dada su particular expresión en células B1a peritoneales y su capacidad de reconocer antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus*.

2.2. Objetivo general.

Estudiar las variaciones en la expresión de los receptores CD5 y CD6 sobre poblaciones linfocitarias de ratones con baja (C57Bl/6) y alta (Balb/c) susceptibilidad al modelo de EQ secundaria.

2.3. Objetivos específicos.

2.3.1. Objetivo específico #1.

Caracterizar las poblaciones linfocitarias peritoneales y de bazo que expresan CD5 y/o CD6 en ratones Balb/c y C57Bl/6 durante la etapa temprana de infección en el modelo de EQ secundaria.

2.3.2. Objetivo específico #2.

Analizar los efectos inducidos por antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* sobre la expresión de CD5 y CD6 en cultivos de células peritoneales vírgenes obtenidas de ratones Balb/c y C57Bl/6.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales.

En todos los experimentos se utilizaron ratones hembras Balb/c y C57Bl/6 normales de 8-12 semanas de edad. Los mismos se obtuvieron del Bioterio de Cría de la Dirección de Laboratorios Veterinarios “Dr. Miguel Rubino” (DI.LA.VE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (M.G.A.P.). Los ratones se mantuvieron en condiciones convencionales en el Laboratorio de Experimentación Animal del Instituto de Higiene (Universidad de la República). Los mismos estuvieron bajo condiciones reguladas y controladas de ciclos luz/oscuridad (12hs/12hs) y temperatura (24°C), y se los alimentó *ad libitum* con ración y agua esterilizadas. Los procedimientos realizados siguieron las Normas de Trabajo con Animales de Experimentación establecidas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A.) de la Universidad de la República, y fueron llevados a cargo por el Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin (habilitado C.H.E.A. en las categorías B y C2), ya que el tesista aún no posee la habilitación correspondiente.

3.2. Parásitos.

Los PSC se obtuvieron mediante punción aséptica de quistes hidáticos fértiles de origen bovino según [Baz et al. \(1995\)](#). Una vez obtenidos, se los lavó varias veces con buffer fosfato salino (PBS) pH 7.2 conteniendo gentamicina (40 µg/mL) y su viabilidad se determinó mediante tinción (exclusión) con eosina (0.5% w/v) [[Dematteis et al., 2003](#)]. Solo se utilizaron aquellos lotes de PSC con valores de viabilidad superior al 90%.

3.3. Obtención del extracto PSEx.

La obtención del extracto de antígenos tegumentarios de PSC se realizó siguiendo el protocolo descrito por [Hernández & Nieto \(1994\)](#). Brevemente, se incubaron 125.000 PSC viables/mL de solución de extracción (detergente MEGA-10 1% w/v; EDTA 5mM y PMSF 2mM en PBS) durante 2hs a temperatura ambiente y con rotación constante. Luego, el sobrenadante se dializó extensamente contra PBS y la fracción obtenida

(denominada PSEx) se conservó a -20°C hasta su uso. La integridad de los PSC post-tratamiento se confirmó mediante microscopía óptica con tinción por eosina [Dematteis *et al.*, 2003].

3.4. Cuantificación de proteínas en PSEx.

La concentración proteica de PSEx se determinó empleando el método del ácido bicinónico (Kit QuantiPro BCA Assay, Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando una curva de calibración realizada con BSA (albúmina sérica bovina) partiendo desde una concentración inicial de 60 µg/mL en PBS.

3.5. Infecciones experimentales.

El modelo de EQ secundaria murina se realizó en forma convencional según la experiencia propia del grupo de investigación [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a; Cucher *et al.*, 2013; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a&b]. Para ello se utilizó un grupo de ratones Balb/c y otro de ratones C57Bl/6 (n=15 de cada cepa). Los ratones de ambos grupos se inocularon por vía i.p. con una suspensión de 2.000 PSC viables en 200 µL de PBS estéril utilizando agujas estériles de calibre 23G. Se utilizaron grupos adicionales de ratones Balb/c y C57Bl/6 vírgenes (n=5 de cada cepa) como controles para la caracterización basal de los animales.

3.6. Obtención de células peritoneales y esplenocitos.

En distintos puntos temporales de la infección temprana (días 0, 7, 14 y 21 p.i.) se realizó la eutanasia de n=5 ratones de cada cepa mediante dislocación cervical con previa anestesia inhalatoria por isofluorano. Se lavó la cavidad peritoneal de cada ratón 5 veces con 2 mL de PBS frío suplementado con 2% de suero fetal bovino (FCS). Luego, se extrajo y se perfundió el bazo de cada ratón 2 veces con 4 mL de PBS-FCS (2%) frío; y se disgregó mecánicamente sobre placas de Petri. Las suspensiones celulares obtenidas (lavados peritoneales y suspensiones de esplenocitos) se

centrifugaron durante 7 min. a 1.200 r.p.m. y a los pellets resultantes se les lisaron los eritrocitos mediante buffer de lisis comercial (*Red Blood Cell Lysing Buffer*, Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se lavaron las células 2 veces con PBS, se resuspendieron en PBS-FCS (2%) y se determinó su número y viabilidad por recuento automático mediante Cellometer® realizando tinciones con azul de tripán.

3.7. Cultivos de células peritoneales.

Para la realización de ensayos *in vitro* de células peritoneales estimuladas con antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* (PSEx), se realizó la eutanasia de ratones Balb/c y C57Bl/6 vírgenes (n=3 de cada cepa) mediante dislocación cervical con previa anestesia inhalatoria por isofluorano. Se lavó la cavidad peritoneal de cada ratón siguiendo el mismo procedimiento descrito en la actividad 3.6 pero en condiciones de esterilidad. Luego de la lisis de eritrocitos, las células peritoneales obtenidas se mezclaron según cada cepa de ratones y se determinó su número y viabilidad por recuento directo en cámara de Neubauer mediante tinción con azul de tripán. A continuación se resuspendieron las células en medio de cultivo estéril RPMI (con 1 g/L de bicarbonato) completo (suplementado con FCS 10%, estreptomycin 100 µg/mL y penicilina 100 U/mL). Luego, se las sembró a razón de 2×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo en U, y se las incubó con concentraciones crecientes de PSEx (5-40 µg/mL) durante 72hs a 37°C en una atmósfera controlada con CO₂ al 5%. Pocillos adicionales se cultivaron con LPS (10 µg/mL) o medio de cultivo completo como controles positivos y negativos de estímulo, respectivamente. Una vez culminados las incubaciones, se centrifugó la placa durante 7 min a 1.200 r.p.m., se descartó el sobrenadante y el pellet de células se utilizó para su caracterización fenotípica mediante citometría de flujo.

3.8. Marcado celular para caracterización por citometría de flujo.

Para la caracterización fenotípica de las células provenientes de ratones infectados y de cultivos celulares, se dispuso 2×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en U y se centrifugó la/s placa/s durante 7 min. a 1.200 r.p.m. y 4°C. Los receptores Fc se bloquearon adicionando 100 µL/pocillo de Mouse BD Fc Block

(PharMingen #553142) diluido 1/400 en PBS-BSA(0,5% w/v)-Na₃N(0,02% w/v) e incubando durante 20 min. a 4°C. A continuación, las células -salvo aquellas destinadas a utilizarse como controles isotípicos- se incubaron con 100 µL de una dilución 1/200 de anticuerpo monoclonal conjugado a biotina específico para la molécula CD5 de ratón durante 20 min. a 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante -previa centrifugación durante 7 min. a 1.200 r.p.m. y 4°C- y se incubó las células con un cóctel de anticuerpos para caracterizar linfocitos B (CD19-FITC, CD6-PE y estreptavidina-PE/Cy5) o linfocitos T (CD3-FITC, CD6-PE y estreptavidina-PE/Cy5). En todos los casos se utilizaron anticuerpos monoclonales generados en rata (anti-CD5-biotina, PharMingen #01032D; estreptavidina-PE/Cy5, Biolegend #405205; anti-CD6-PE, Biolegend #146404; anti-CD19-FITC, PharMingen #553785; anti-CD3-FITC, PharMingen #555274). En paralelo, se incubaron células con los controles isotípicos correspondientes (IgG2aκ-FITC, PharMingen #553929; IgG2bκ-FITC, PharMingen #553988; IgG2aκ-PE, PharMingen #553930; estreptavidina-PE/Cy5, Biolegend #405205, este último sin la marca primaria con anti-CD5-biotina). En todos los casos, los anticuerpos se diluyeron en PBS-BSA(0,5% w/v)-Na₃N(0,02% w/v) y las incubaciones se realizaron durante 20 min. a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se centrifugaron durante 7 min. a 1.200 r.p.m. y 4°C, y se resuspendieron en 200 µL de FACS Buffer (Becton Dickinson) suplementado con paraformaldehído (0,5% v/v) (Dorwil). La adquisición de eventos se realizó en un citómetro de flujo *FACScalibur*[®] (Becton Dickinson) utilizando el software *CellQuest*[®]. El análisis de datos final se realizó mediante el uso del software libre *FlowingSoftware*[®] (www.flowingsoftware.btk.fi).

3.9. Estrategia de análisis de los resultados obtenidos por citometría de flujo.

Con el fin de analizar los resultados obtenidos por citometría de flujo se eligió la siguiente estrategia. En primer lugar se caracterizaron los leucocitos y linfocitos totales en base a sus valores de FSC (“tamaño celular”) y SSC (“complejidad celular”) representados a través de gráficos de tipo *dot plot*. En segundo lugar, se realizó un *gate* o región sobre la población de linfocitos, y nuevamente mediante *dot plot* se identificaron las poblaciones CD19⁺ (células B) o CD3⁺ (células T). Por último, se definió una nueva región sobre la población marcada y a continuación, mediante gráficos de tipo histograma, se caracterizó la expresión de CD5 y de CD6 dentro de ambas poblaciones linfoides bajo estudio.

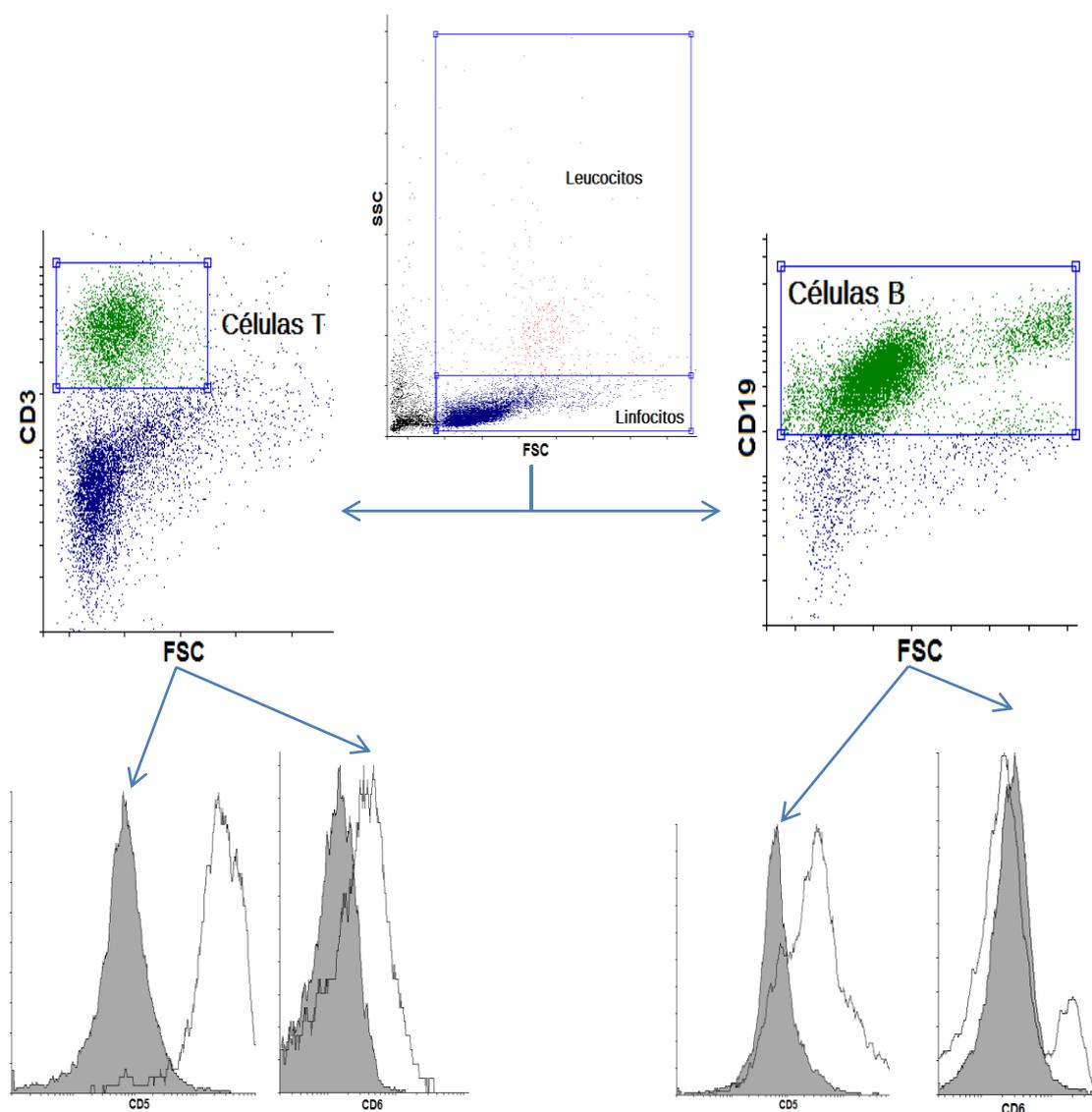


Figura 3.1. Esquema de análisis de datos por citometría de flujo. En la figura se muestra la estrategia de *gating* utilizada para el análisis de los resultados obtenidos.

3.10. Análisis estadístico.

Para evaluar diferencias entre los grupos resultantes de los estudios *in vivo* se utilizó el test no-paramétrico U de Mann-Whitney; mientras que para el análisis de los resultados obtenidos *in vitro* se trabajó con el test paramétrico t-Student. En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

El objetivo general de trabajo fue analizar las variaciones en el perfil de expresión de los receptores CD5 y CD6 sobre poblaciones linfocitarias de ratones con baja (C57Bl/6) y alta (Balb/c) susceptibilidad a la infección secundaria experimental por *E. granulosus*. Para ello, nos planteamos 2 objetivos específicos, y en este sentido, los resultados que se muestran a continuación se agruparon de acuerdo a cada uno de los mismos.

4.1. Caracterización de las poblaciones linfocitarias CD5⁺ y CD6⁺ durante la etapa temprana de la EQ secundaria.

Con el objetivo de caracterizar las poblaciones linfocitarias CD5⁺ y CD6⁺ en el contexto de la EQ secundaria murina, se inocularon por vía i.p. ratones Balb/c y C57Bl/6 con una suspensión de 2.000 PSC viables de *E. granulosus*. Luego, en distintos puntos temporales de la etapa temprana, se realizó la eutanasia de individuos pertenecientes a ambos grupos y se obtuvieron sus células peritoneales y de bazo. En paralelo, se utilizaron grupos adicionales de ratones de ambas cepas sin infectar como controles basales (día 0 de infección). Con las células obtenidas, se realizó la caracterización de las poblaciones linfocitarias CD5⁺ y CD6⁺ mediante citometría de flujo. A partir de los datos obtenidos, se analizaron las variaciones en el número de células CD19⁺ (linfocitos B) y CD3⁺ (linfocitos T) que expresan CD5 o CD6, así como los niveles de expresión de ambos receptores sobre dichas poblaciones. Estos análisis se realizaron sobre células peritoneales y de bazo, y por ello, con el objetivo de simplificar la interpretación de los datos, a continuación se muestran los resultados agrupados según origen anatómico de las células.

4.1.1. Caracterización de las poblaciones linfocitarias peritoneales.

En primer lugar, se analizaron las variaciones numéricas en cuanto a leucocitos totales, linfocitos totales, linfocitos CD3⁺ (células T) y linfocitos CD19⁺ (células B) (Figura 4.1.). Los resultados obtenidos a nivel basal mostraron que tanto el número de leucocitos totales como de linfocitos totales no fue significativamente distinto entre cepas, si bien mostraron una tendencia a ser menores en ratones de la cepa C57Bl/6

respecto a Balb/c ($p=0.064$ en ambos casos) (Figura 4.1.A & B). Por otro lado, aunque no se observaron diferencias entre cepas en el número de linfocitos CD3⁺ (Figura 4.1.C), sí se observó un número significativamente menor de linfocitos CD19⁺ en ratones de la cepa C57Bl/6 respecto a Balb/c (Figura 4.1.D).

Por su parte, en el contexto de la infección experimental los ratones de la cepa C57Bl/6 mostraron un aumento significativo en el número de leucocitos totales en todos los puntos temporales analizados (Figura 4.1.A). Asimismo, en dichos ratones se observó un aumento significativo en el número de linfocitos totales en los días 7 y 14 p.i., los cuales retornaron a valores basales en el día 21 p.i. (Figura 4.1.B). Por otro lado, en los ratones de la cepa Balb/c, aunque se observó una tendencia hacia el aumento del número de leucocitos totales en el día 7 p.i. ($p=0.064$), el único aumento significativo reportado ocurrió en el día 14 p.i., retornando luego a valores basales (Figura 4.1.A). En la misma cepa de ratones, pero para el caso de linfocitos totales, se observó únicamente una tendencia hacia el aumento en el día 7 p.i. ($p=0.064$) (Figura 4.1.B). Por su parte, el número de linfocitos CD3⁺ mostró igual comportamiento cinético en ambas cepas de ratones: aumento significativo en los días 7 y 14 p.i., seguido de un retorno a valores basales sobre el día 21 p.i. (Figura 4.1.C). Asimismo, el número de linfocitos CD3⁺ en el día 7 p.i. mostró ser significativamente mayor en ratones de la cepa Balb/c (Figura 4.1.C). Por último, en ambas cepas de ratones no se observaron variaciones significativas en el número de linfocitos CD19⁺, aunque se observó una tendencia hacia el aumento en el día 7 p.i. para la cepa C57Bl/6 ($p=0.056$) (Figura 4.1.D).

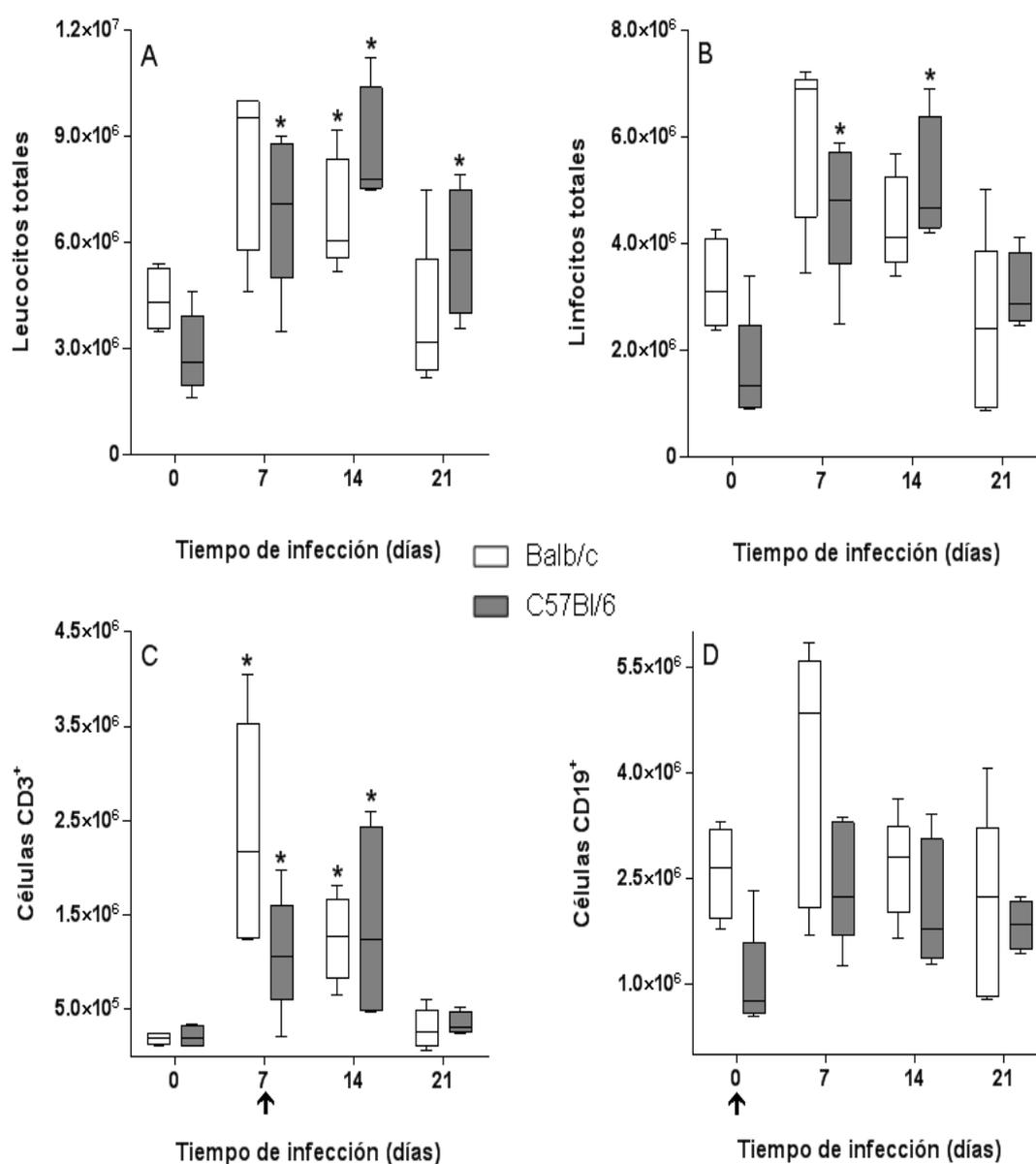


Figura 4.1. Caracterización de poblaciones peritoneales. En la figura se muestra el número absoluto de leucocitos totales (A), linfocitos totales (B), linfocitos CD3⁺ (C) y linfocitos CD19⁺ (D) a nivel de cavidad peritoneal en ratones Balb/c y C57Bl/6 en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (día 0), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto temporal.

4.1.1.1. Caracterización de las poblaciones peritoneales CD3⁺ que expresan CD5 o CD6.

Luego de analizar en forma global el comportamiento de las distintas poblaciones a estudiar, se procedió al análisis específico de la expresión de CD5 o CD6 sobre los linfocitos CD3⁺ o CD19⁺.

El análisis de los linfocitos CD3⁺ mostró que a nivel basal no se evidencian diferencias entre cepas en cuanto al número de linfocitos peritoneales CD3⁺CD5⁺ (Figura 4.2.A). Por otro lado, el nivel de expresión de CD5 en linfocitos CD3⁺ de ratones C57Bl/6 mostró una tendencia ($p=0.064$) hacia valores menores respecto a los ratones Balb/c (Figura 4.2.B).

Por su parte, en el contexto de la infección experimental, el número de linfocitos CD3⁺CD5⁺ en ratones Balb/c mostró aumentos significativos en los días 7 y 14 p.i., mientras que en los ratones de la cepa C57Bl/6 se observaron tendencias al aumento en los mismos puntos temporales ($p=0.056$ y $p=0.064$ en el día 7 y 14 p.i., respectivamente) (Figura 4.2.A). En ambas cepas, los números de linfocitos CD3⁺CD5⁺ retornaron a valores basales en el día 21 p.i. (Figura 4.2.A). En cuanto a la intensidad de expresión de CD5 en linfocitos CD3⁺, la misma disminuyó en ambas cepas a medida que avanza la infección, mostrando descensos significativos en los días 14 y 21 p.i. para los ratones Balb/c, y en el día 21 p.i. para los ratones C57Bl/6 (Figura 4.2.B).

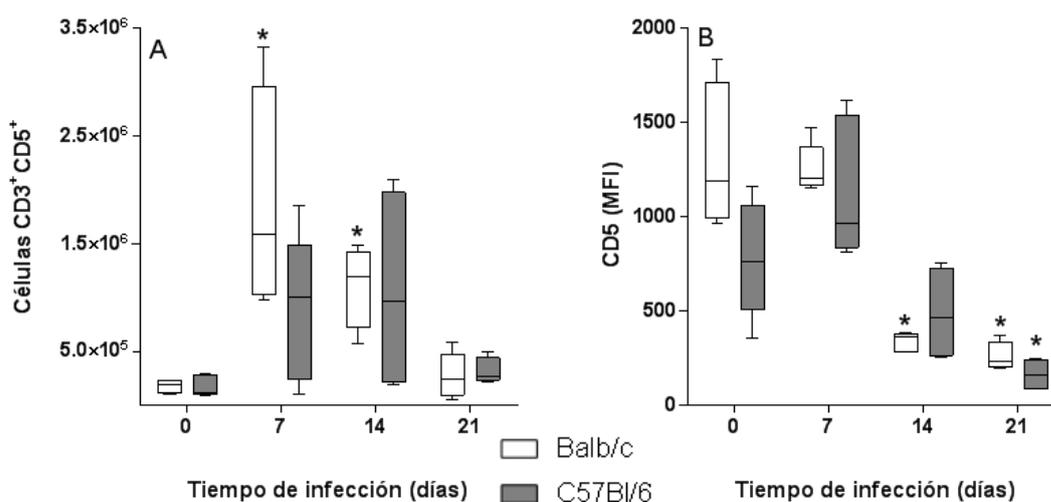


Figura 4.2. Caracterización de la expresión de CD5 en linfocitos CD3⁺ peritoneales. En la figura se muestra el número absoluto de linfocitos CD3⁺CD5⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD5 sobre linfocitos CD3⁺ (B) a nivel de cavidad peritoneal en ratones

Balb/c y C57Bl/6 en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (día 0), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto temporal.

En lo que respecta al análisis de expresión de CD6 sobre linfocitos peritoneales CD3⁺, los resultados obtenidos a nivel basal no mostraron diferencias entre cepas de ratones en el número de linfocitos CD3⁺CD6⁺ (Figura 4.3.A) ni en los niveles de expresión de CD6 sobre dichas células (Figura 4.3.B).

Asimismo, durante la etapa temprana de la infección experimental, no se observaron grandes diferencias entre cepas de ratones en cuanto al comportamiento de la población de linfocitos CD3⁺CD6⁺. En los ratones de la cepa C57Bl/6 se observó un aumento significativo en el número de linfocitos CD3⁺CD6⁺ en todos los puntos temporales analizados, mientras que en los ratones de la cepa Balb/c dichos aumentos se observaron solo en los días 7 y 14 p.i. (Figura 4.3.A). Por su parte, el nivel de expresión de CD6 en linfocitos CD3⁺ disminuye significativamente a medida que transcurre la infección en ambas cepas, aunque con mayor velocidad aparente en los ratones Balb/c (Figura 4.3.B).

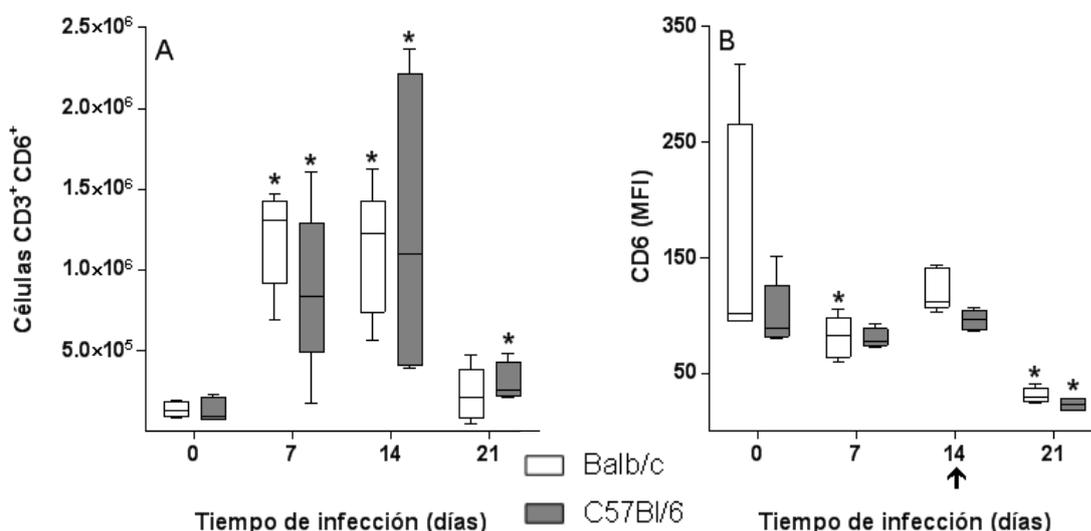


Figura 4.3. Caracterización de la expresión de CD6 en linfocitos CD3⁺ peritoneales. En la figura se muestra el número absoluto de linfocitos CD3⁺CD6⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD3⁺ (B) a nivel de cavidad peritoneal en ratones Balb/c y C57Bl/6 en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (día 0), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto temporal.

4.1.1.2. Caracterización de las poblaciones peritoneales CD19⁺ que expresan CD5 o CD6.

Luego de caracterizar el comportamiento de los linfocitos peritoneales CD3⁺ en cuanto a su expresión de CD5 o CD6, se procedió a realizar un análisis análogo sobre la población de linfocitos CD19⁺ peritoneales.

En primer lugar, los resultados a nivel basal mostraron que los ratones de la cepa C57Bl/6 presentan un número significativamente menor de linfocitos peritoneales CD19⁺CD5⁺ (linfocitos B1a) en comparación con los ratones Balb/c (Figura 4.4.A). Sin embargo, no se observaron diferencias entre cepas en cuanto al nivel de expresión de CD5 sobre dichos linfocitos (Figura 4.4.B).

Por otro lado, en el contexto de la infección experimental, no se observaron grandes cambios en el número de linfocitos CD19⁺CD5⁺ en los ratones de la cepa C57Bl/6, aunque se apreciaron tendencias al alza en los días 7 ($p=0.056$) y 21 p.i. ($p=0.064$) (Figura 4.4.A). En el caso de los ratones Balb/c, no se observaron grandes variaciones, salvo un descenso significativo en el día 21 p.i., haciendo que en dicho punto temporal ambas cepas de ratones muestren diferencias significativas en el número de linfocitos CD19⁺CD5⁺ peritoneales (Figura 4.4.A). Respecto a los niveles de expresión de CD5 en linfocitos CD19⁺ durante la infección, se observó un descenso significativo de los mismos en ambas cepas de ratones a medida que transcurre el tiempo (Figura 4.4.B).

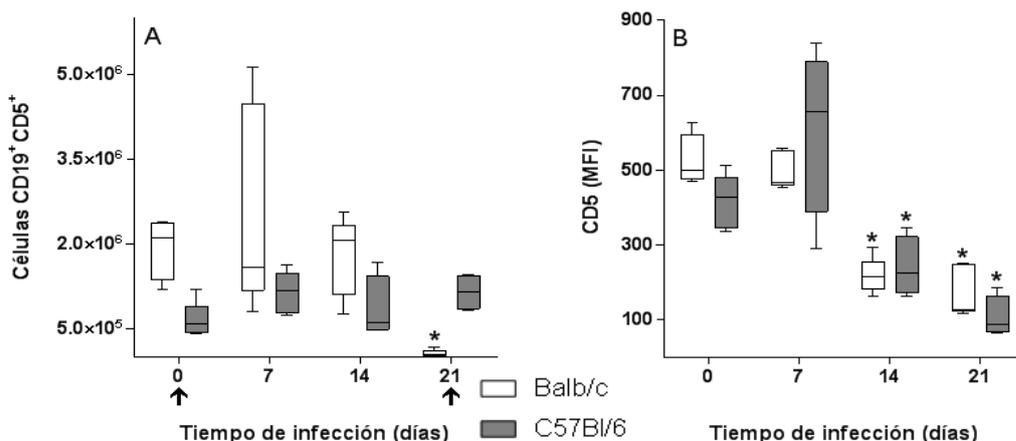


Figura 4.4. Caracterización de la expresión de CD5 en linfocitos CD19⁺ peritoneales. En la figura se muestra el número absoluto de linfocitos CD19⁺CD5⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD5 sobre linfocitos CD19⁺ (B) a nivel de cavidad peritoneal en ratones Balb/c y C57Bl/6 en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (día 0), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto temporal.

En lo que respecta a la expresión de CD6 sobre linfocitos peritoneales CD19⁺, cabe destacar que a nivel basal no se observaron diferencias entre cepas en el número de linfocitos CD19⁺CD6⁺ (Figura 4.5.A), aunque sí se observó que los ratones C57Bl/6 en comparación con los Balb/c mostraron niveles menores de expresión de CD6 sobre dichos linfocitos (Figura 4.5.B).

Por otro lado, durante la etapa temprana de la infección experimental se observó que mientras en los ratones C57Bl/6 aumentó en forma sostenida el número de linfocitos CD19⁺CD6⁺, en los ratones Balb/c dicho aumento fue puntual (día 7 p.i.) (Figura 4.5.A). Respecto a los niveles de expresión de CD6 en linfocitos CD19⁺, los resultados obtenidos mostraron que, al igual que para CD5 (Figura 4.4.B), los mismos disminuyen significativamente en ambas cepas de ratones a medida que avanza la infección (Figura 4.5.B). En este punto es interesante destacar que la magnitud del descenso en la expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ sería mayor en los ratones Balb/c respecto a los C57Bl/6 (Figura 4.5.B).

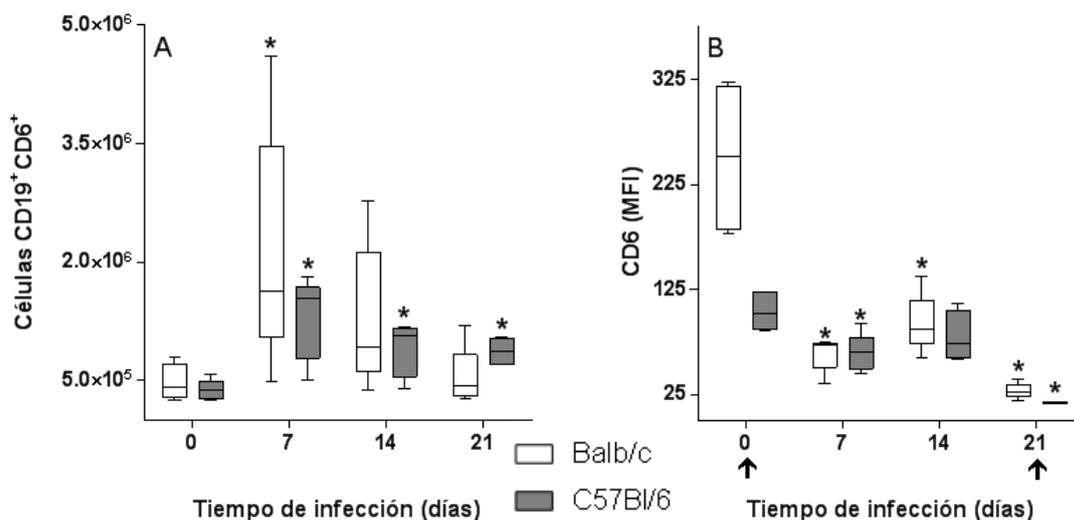


Figura 4.5. Caracterización de la expresión de CD6 en linfocitos CD19⁺ peritoneales. En la figura se muestra el número absoluto de linfocitos CD19⁺CD6⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ (B) a nivel de cavidad peritoneal en ratones Balb/c y C57Bl/6 en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (día 0), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto temporal.

4.1.2. Caracterización de las poblaciones linfocitarias en bazo.

Como se mencionó previamente, el análisis de las poblaciones linfoides que expresan CD5 o CD6 se realizó tanto sobre células peritoneales como sobre células de bazo. Al igual que lo realizado con células peritoneales, sobre las células de bazo se analizó en primer lugar, las variaciones numéricas en cuanto a leucocitos totales, linfocitos totales, linfocitos CD3⁺ (células T) y linfocitos CD19⁺ (células B). En este sentido, los resultados obtenidos a nivel basal no mostraron diferencias significativas entre ratones de la cepa Balb/c y C57Bl/6 (Figura 4.6.).

Por otro lado, en el contexto de la etapa temprana de EQ secundaria, se observó un descenso en el número de las cuatro poblaciones analizadas con perfiles cinéticos similares en ambas cepas de ratones. Así, para el caso de los leucocitos totales se observó una tendencia hacia el descenso en el día 7 p.i. ($p=0.064$ y $p=0.052$ para

ratones Balb/c y C57Bl/6, respectivamente), con valores significativamente menores a partir del día 14 p.i. (Figura 4.6.A). Un comportamiento similar se observó para la población de linfocitos totales, con la salvedad que el descenso fue significativo en todos los puntos temporales para la cepa Balb/c, mientras que para la cepa C57Bl/6 en el día 7 p.i. se observó una tendencia al descenso ($p=0.052$) seguida de valores significativamente menores (Figura 4.6.B). Por último, y en línea con estos resultados sobre linfocitos totales, a medida que avanzó la etapa temprana de infección, se observaron descensos tanto en el número de linfocitos CD3⁺ como CD19⁺ en ambas cepas de ratones (Figura 4.6.C & D). Para el caso de los linfocitos CD3⁺, se observó una tendencia al descenso numérico en el día 7 p.i. respecto a sus valores basales ($p=0.064$ y $p=0.052$ para ratones Balb/c y C57Bl/6, respectivamente), volviéndose significativamente menores en los días 14 y 21 p.i. (Figura 4.6.C). Por su parte, para el caso de linfocitos CD19⁺ se observó también un comportamiento de descenso a medida que transcurrió la etapa temprana de infección, con pequeñas fluctuaciones de tipo tendencia ($p=0.082$ en el día 7 p.i. para ratones C57Bl/6, y $p=0.064$ en el día 14 p.i. para ratones Balb/c) (Figura 4.6.D). Por último, cabe destacar que en ninguno de los puntos temporales analizados se observaron diferencias significativas, o tendencias, entre cepas de ratones (Figura 4.6.).

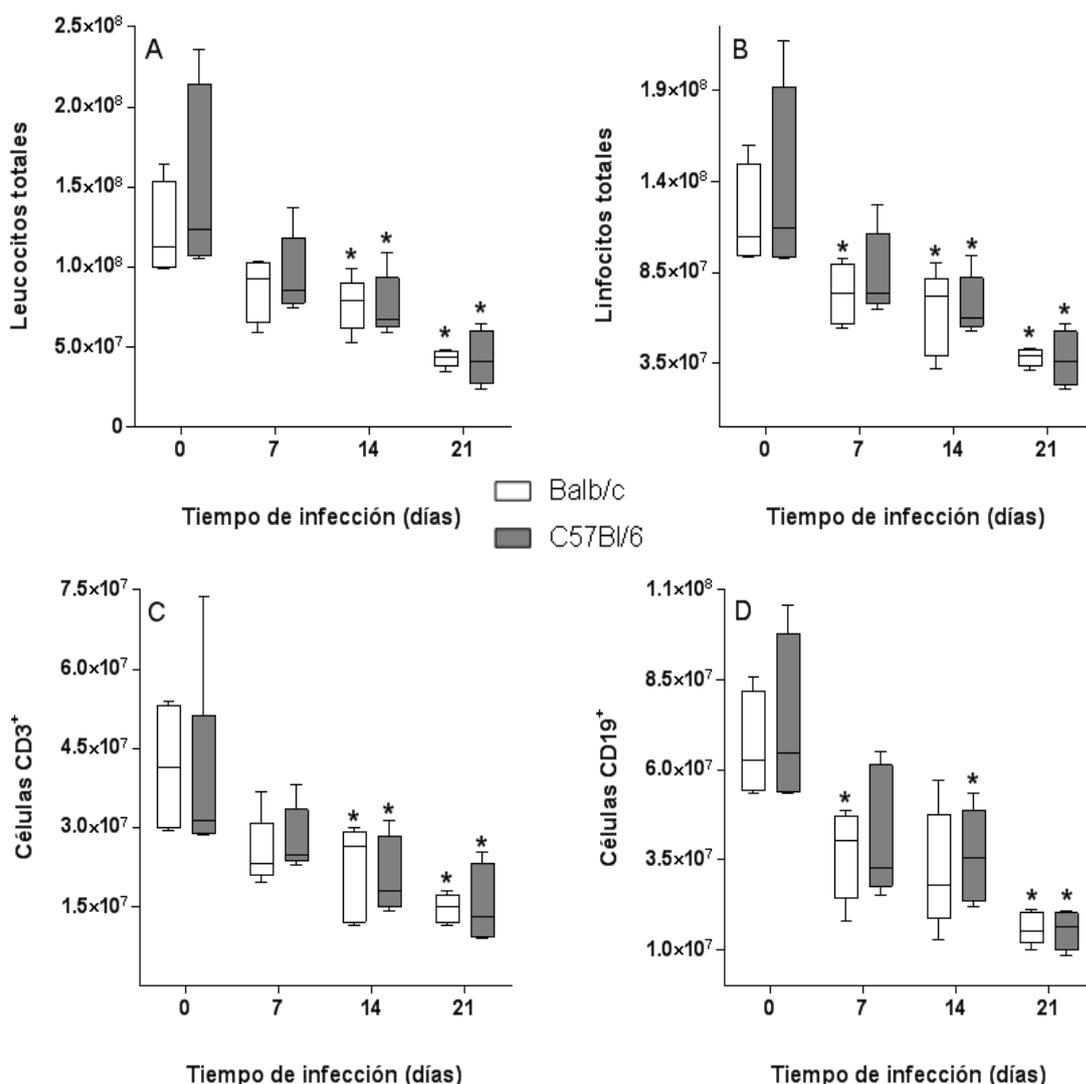


Figura 4.6. Caracterización de poblaciones en bazo. En la figura se muestra el número absoluto de leucocitos totales (A), linfocitos totales (B), linfocitos CD3⁺ (C) y linfocitos CD19⁺ (D) a nivel de bazo en ratones Balb/c y C57Bl/6 en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (día 0), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto temporal.

4.1.2.1. Caracterización de las poblaciones esplénicas CD3⁺ que expresan CD5 o CD6.

En forma análoga a lo realizado sobre las poblaciones peritoneales, luego de analizar en forma global el comportamiento de las distintas poblaciones a estudiar, se procedió al análisis específico de la expresión de CD5 o CD6 sobre los linfocitos CD3⁺ o CD19⁺ en bazo.

En primer lugar, el análisis de los linfocitos CD3⁺ mostró que a nivel basal no se evidenciaron diferencias significativas entre cepas en cuanto al número de linfocitos CD3⁺CD5⁺ (Figura 4.7.A) ni respecto a la intensidad de expresión de CD5 sobre aquellos linfocitos CD3⁺ (Figura 4.7.B). Por su parte, en el contexto de la etapa temprana de infección, se observó un descenso significativo en el número de linfocitos CD3⁺CD5⁺ en todos los puntos temporales analizados y para ambas cepas de ratones respecto a sus valores basales (Figura 4.7.A). En cuanto a los niveles de expresión de CD5 en linfocitos CD3⁺, no se observaron grandes variaciones en la ventana de tiempo analizada, salvo un descenso significativo puntual para la cepa Balb/c en el día 21 p.i. (Figura 4.7.B).

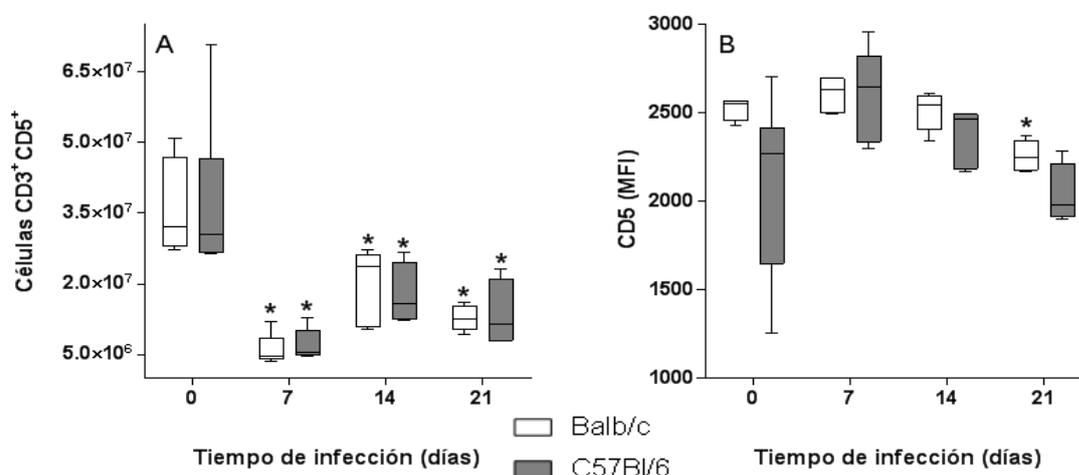


Figura 4.7. Caracterización de la expresión de CD5 en linfocitos CD3⁺ de bazo. En la figura se muestra el número absoluto de linfocitos CD3⁺CD5⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD5 sobre linfocitos CD3⁺ (B) a nivel de bazo en ratones Balb/c y C57Bl/6 en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (día 0), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto temporal.

Por otro lado, si bien a nivel basal no se observaron diferencias significativas en el número de linfocitos CD3⁺CD6⁺ entre ambas cepas de ratones (Figura 4.8.A), sí se observó una menor intensidad de expresión de CD6 en los linfocitos CD3⁺ de la cepa Balb/c (Figura 4.8.B). De forma interesante, y a diferencia de lo observado para linfocitos CD3⁺CD5⁺ (Figura 4.7.), el número de linfocitos CD3⁺CD6⁺ no mostró grandes variaciones durante la etapa temprana de la infección experimental (Figura 4.8.A), si bien el nivel de expresión de CD6 en dicha población mostró aumentos significativos respecto a los valores basales de cada cepa de ratones (Figura 4.8.B).

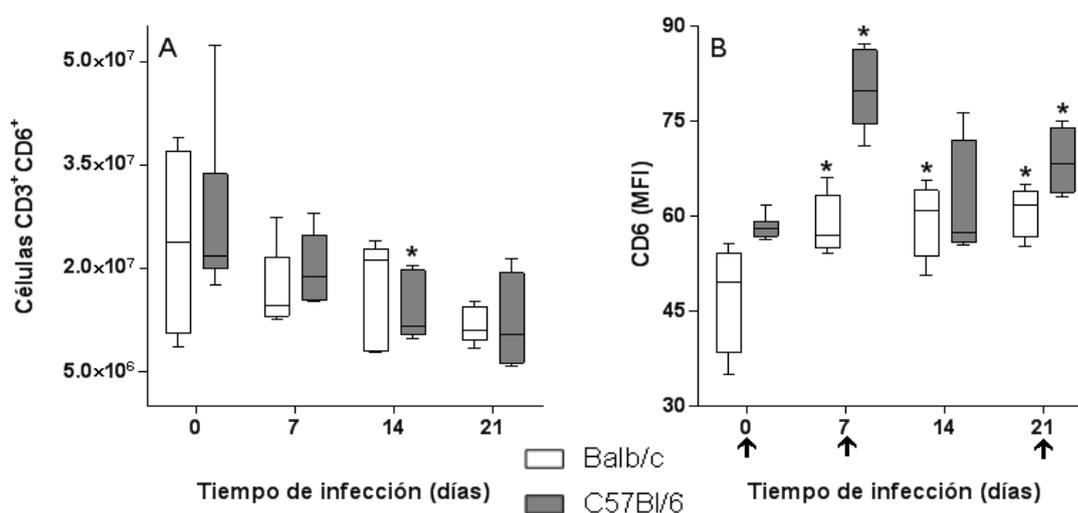


Figura 4.8. Caracterización de la expresión de CD6 en linfocitos CD3⁺ de bazo. En la figura se muestra el número absoluto de linfocitos CD3⁺CD6⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD3⁺ (B) a nivel de bazo en ratones Balb/c y C57Bl/6 en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (día 0), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto temporal.

4.1.2.2. Caracterización de las poblaciones esplénicas CD19⁺ que expresan CD5 o CD6.

En segundo lugar, el análisis de los linfocitos CD19⁺ de bazo mostró que a nivel basal no se evidenciaron diferencias significativas entre cepas en cuanto al número de linfocitos CD19⁺CD5⁺ (Figura 4.9.A) ni respecto a la intensidad de expresión de CD5 sobre aquellos linfocitos CD19⁺ (Figura 4.9.B).

Por otro lado, y a diferencia de lo observado respecto al número total de linfocitos CD19⁺ durante la etapa temprana de la infección (Figura 4.6.D), los resultados mostraron que, aunque con distinto perfil cinético, el número de linfocitos CD19⁺CD5⁺ aumentó significativamente en ambas cepas de ratones. En este sentido, para la cepa Balb/c se observó un aumento significativo del número de dichas células en el día 7 p.i., retornando luego a valores basales. Por su parte, en el caso de los ratones C57Bl/6, el aumento fue más sostenido en el tiempo ya que en el día 7 p.i. se observó una tendencia al aumento en el número de linfocitos CD19⁺CD5⁺ esplénicos ($p=0.052$) que se volvió significativo en el día 14 p.i., retornando a valores basales recién en el día 21 p.i. (Figura 4.9.A). Esta diferencia en perfil cinético derivó en una tendencia de la cepa C57Bl/6 a presentar mayores números de linfocitos CD19⁺CD5⁺ esplénicos en el día 14 p.i. que los ratones Balb/c ($p=0.056$) (Figura 4.9.A). Resulta interesante destacar que el aumento observado en el número de linfocitos CD19⁺CD5⁺ a nivel de bazo en ambas cepas de ratones, ocurre en paralelo con un fenómeno de disminución de los niveles de expresión de CD5 sobre dichas células, también en ambas cepas (Figura 4.9.B).

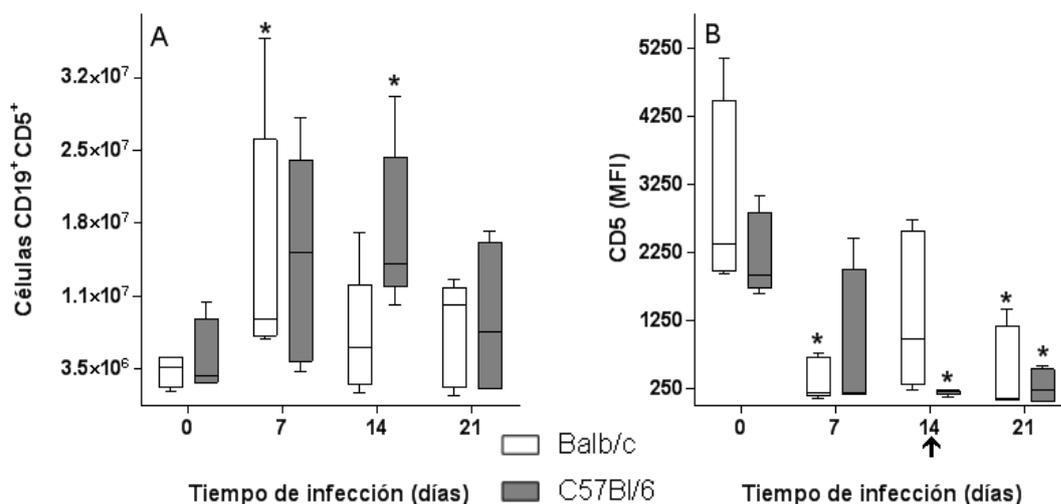


Figura 4.9. Caracterización de la expresión de CD5 en linfocitos CD19⁺ de bazo. En la figura se muestra el número absoluto de linfocitos CD19⁺CD5⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD5 sobre linfocitos CD19⁺ (B) a nivel de bazo en ratones Balb/c y C57Bl/6 en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (día 0), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto temporal.

Por otro lado, a nivel basal no se observaron diferencias significativas entre cepas de ratones ni en el número de linfocitos CD19⁺CD6⁺ (Figura 4.10.A), ni en los niveles de

expresión de CD6 sobre dichas células (Figura 4.10.B). Asimismo, tanto para ratones Balb/c como C57Bl/6, no se observaron grandes variaciones en ambos parámetros durante las primeras etapas de la EQ secundaria (Figura 4.10.).

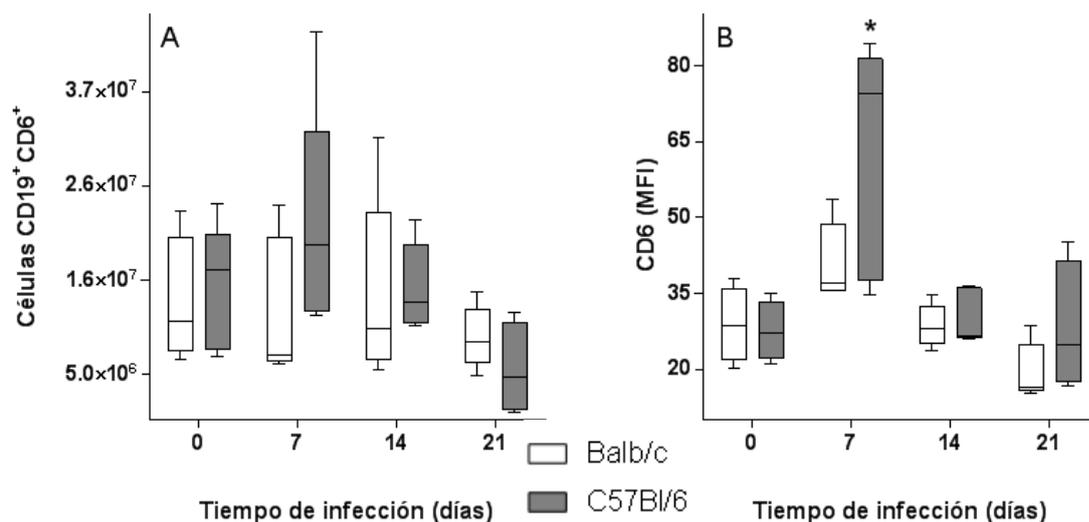


Figura 4.10. Caracterización de la expresión de CD6 en linfocitos CD19⁺ de bazo. En la figura se muestra el número absoluto de linfocitos CD19⁺CD6⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ (B) a nivel de bazo en ratones Balb/c y C57Bl/6 en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (día 0), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto temporal.

4.1.3. Intensidad de expresión de CD5 y CD6: Análisis comparativo entre linfocitos peritoneales y esplénicos.

Luego de realizar el análisis de los perfiles de expresión de CD5 y CD6 sobre poblaciones linfoides de ratones Balb/c y C57Bl/6 durante la etapa temprana de la EQ secundaria, se compararon los niveles de expresión de dichos receptores entre los distintos sitios anatómicos estudiados, es decir, la cavidad peritoneal y el bazo.

En cuanto a CD5, los resultados obtenidos mostraron que los niveles de expresión en linfocitos CD3⁺ fueron mayores a nivel de bazo en ambas cepas de ratones, e independientemente del punto temporal analizado (ya sea basal o durante la infección temprana) (Figura 4.11.A & B).

Por otro lado, si bien a nivel basal el nivel de expresión de CD5 sobre linfocitos CD19⁺ también mostró ser mayor en bazo en ambas cepas de ratones, dicha diferencia básicamente desaparece en el contexto de la etapa temprana de infección experimental (Figura 4.11.C & D).

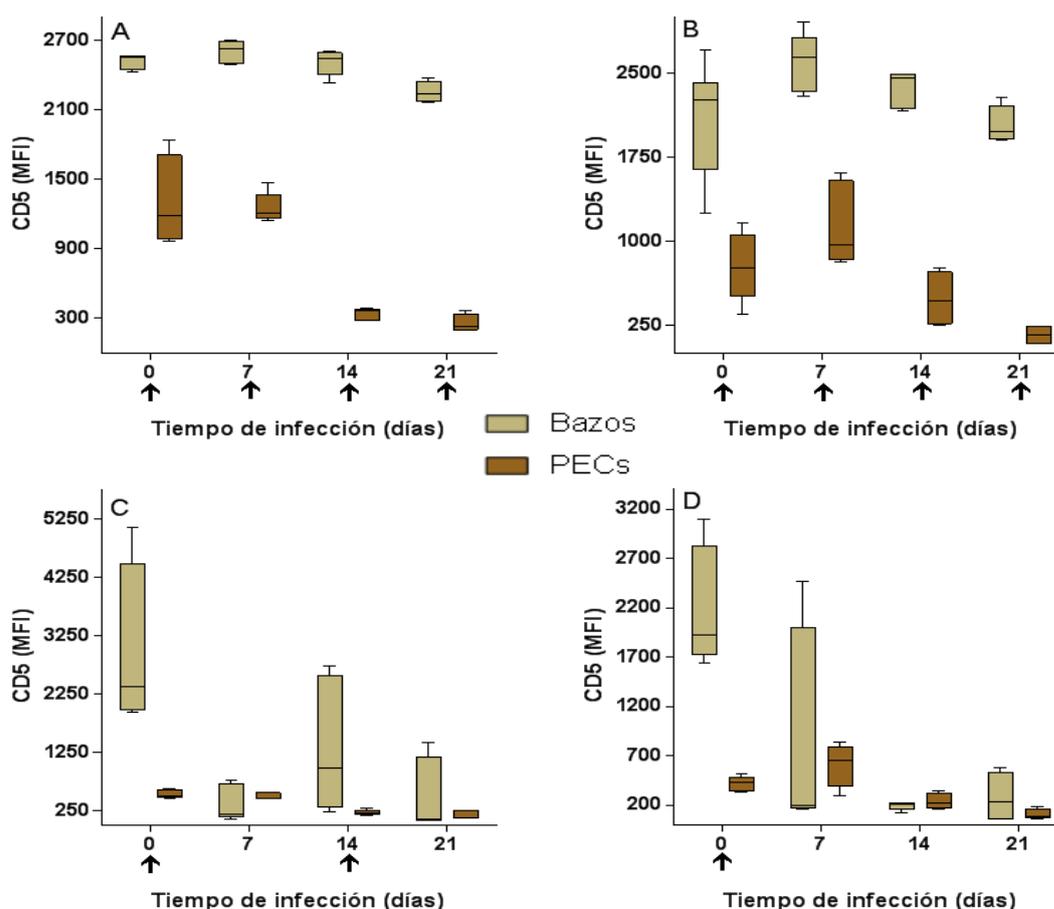


Figura 4.11. Comparación de la expresión de CD5 en linfocitos CD3⁺ o CD19⁺. En la figura se muestra la intensidad de expresión de CD5 a nivel peritoneal y de bazo sobre linfocitos CD3⁺ de ratones Balb/c (A) y C57Bl/6 (B); y sobre linfocitos CD19⁺ de ratones Balb/c (C) y C57Bl/6 (D), en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la comparación entre sitios anatómicos para cada punto temporal se muestran como flechas.

En cuanto a CD6, y a diferencia de lo observado para CD5 (Figura 4.11.A & B), los resultados obtenidos mostraron que los niveles de expresión en linfocitos CD3⁺ fueron mayores a nivel peritoneal en ambas cepas de ratones tanto a nivel basal como en los

días 7 y 14 p.i., invirtiendo esta predominancia hacia mayores niveles de expresión en bazo en el día 21 p.i. (en ambas cepas) (Figura 4.12.A & B).

Por otro lado, y nuevamente a diferencia de los observado para CD5 (Figura 4.11.C & D), los niveles de expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ fueron significativamente (o con tendencias) mayores a nivel peritoneal en ambas cepas de ratones, e independientemente del punto temporal analizado (ya sea basal o durante la infección temprana) (Figura 4.12.C & D).

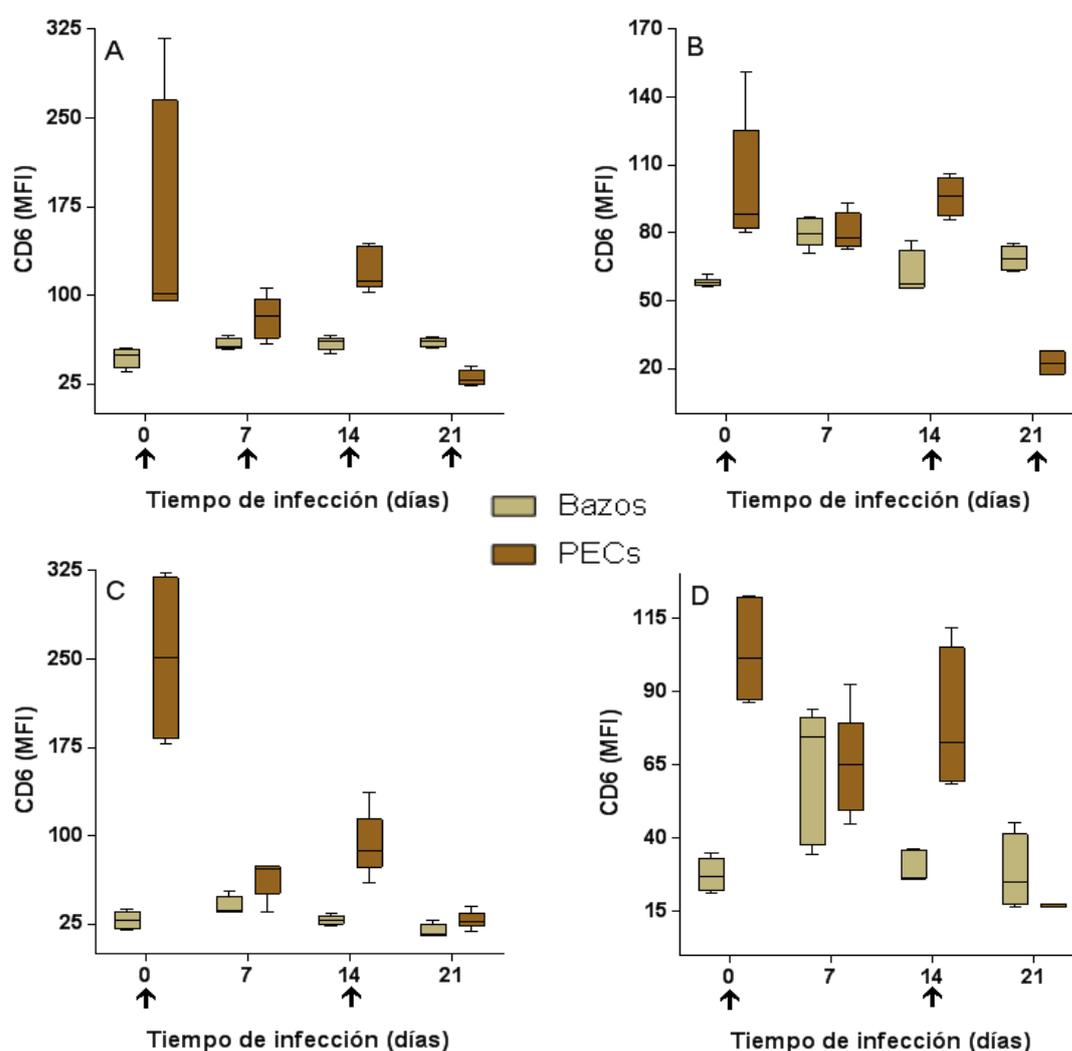


Figura 4.12. Comparación de la expresión de CD6 en linfocitos CD3⁺ o CD19⁺. En la figura se muestra la intensidad de expresión de CD6 a nivel peritoneal y de bazo sobre linfocitos CD3⁺ de ratones Balb/c (A) y C57Bl/6 (B); y sobre linfocitos CD19⁺ de ratones Balb/c (C) y C57Bl/6 (D), en función del tiempo de infección. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la comparación entre sitios anatómicos para cada punto temporal se muestran como flechas.

4.2. Efecto de los antígenos tegumentarios de PSC sobre la expresión de CD5 y CD6 en linfocitos peritoneales.

Como se mencionó previamente, dentro del objetivo general de trabajo nos planteamos 2 objetivos específicos. En este sentido, como segundo objetivo específico nos propusimos analizar los efectos inducidos por antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* sobre la expresión de CD5 y CD6 en cultivos de células peritoneales obtenidas de ratones vírgenes Balb/c y C57Bl/6. Para ello, se obtuvo un extracto antigénico derivado del tegumento de PSC viables (denominado PSEx) que se utilizó para estimular *in vitro* células peritoneales totales obtenidas de ratones vírgenes pertenecientes a ambas cepas de ratones. Los estímulos se realizaron en presencia de concentraciones crecientes de PSEx, utilizando en paralelo LPS como control positivo de estimulación. Luego de 72 horas, se realizó la caracterización de las poblaciones linfocitarias CD5⁺ y CD6⁺ mediante citometría de flujo. A partir de los datos obtenidos, se analizaron las variaciones porcentuales de linfocitos CD19⁺ (linfocitos B) y CD3⁺ (linfocitos T) que expresan CD5 o CD6, así como los niveles de expresión de ambos receptores sobre dichas poblaciones.

4.2.1. Efectos de PSEx sobre las poblaciones linfoides CD3⁺ y CD19⁺.

A nivel basal, es decir en ausencia de estímulo, no se observaron diferencias significativas entre cepas en cuanto al porcentaje de linfocitos CD3⁺ (Figura 4.13.A), mientras que para el caso de los linfocitos CD19⁺ se observó un porcentaje significativamente menor en los cultivos de células peritoneales de ratones C57Bl/6 (Figura 4.13.B), en línea con nuestros resultados obtenidos *in vivo* a nivel basal (Figura 4.1.D).

Por otro lado, bajo las condiciones de estímulo con PSEx, aunque se observaron algunas diferencias significativas puntuales en el porcentaje de linfocitos CD3⁺, las mismas no serían claramente concluyentes (Figura 4.13.A). Por su parte, el porcentaje de linfocitos CD19⁺ en los cultivos de células peritoneales provenientes de ratones C57Bl/6, parecería aumentar en forma dosis-dependiente con el estímulo de PSEx (Figura 4.13.B). Sin embargo, estos análisis en términos porcentuales podrían llevar a

errores de interpretación, ya que en células peritoneales los linfocitos CD3⁺ y CD19⁺ básicamente suman el total de linfocitos, por lo que variaciones porcentuales en una población afectan en igual medida pero con signo opuesto a la otra población.

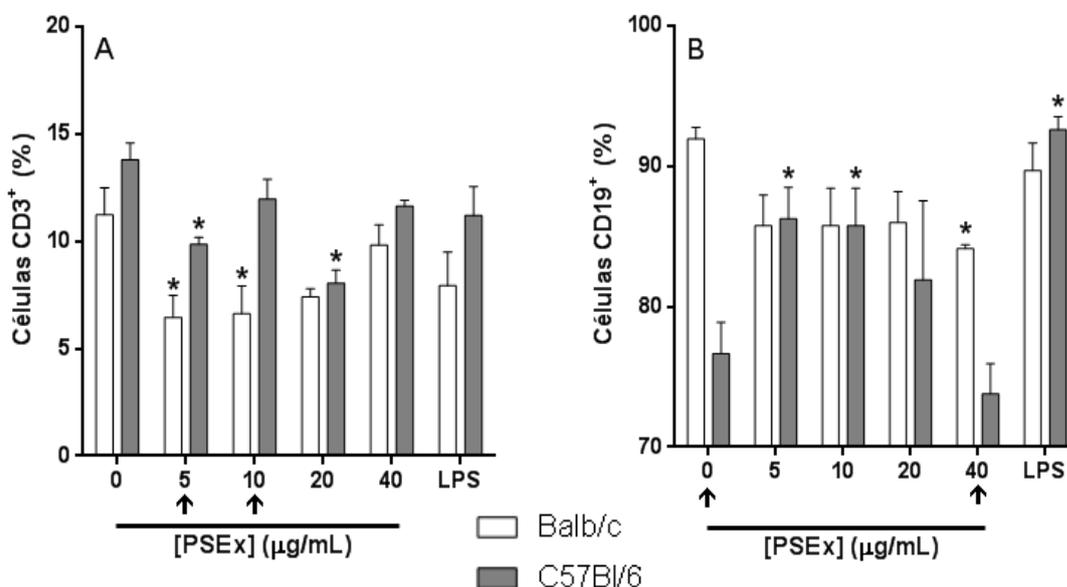


Figura 4.13. Caracterización de las poblaciones CD3⁺ y CD19⁺ estimuladas con PSEx. En la figura se muestra el porcentaje de linfocitos CD3⁺ (A) y CD19⁺ (B) en cultivos de células peritoneales obtenidas de ratones vírgenes Balb/c y C57Bl/6 estimuladas con PSEx durante 72 horas. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (sin estímulo), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto.

4.2.2. Efectos de PSEx sobre la expresión de CD5 y CD6 en linfocitos CD3⁺.

Una vez analizado el comportamiento global de las poblaciones linfoides CD3⁺ y CD19⁺, se procedió a describir el perfil de expresión de CD5 y CD6 sobre ambas poblaciones. En cuanto a la población de células CD3⁺CD5⁺ a nivel basal, no se observaron diferencias significativas entre cepas de ratones ni a nivel de porcentaje de linfocitos CD3⁺CD5⁺ (Figura 4.14.A), ni en términos de la intensidad de expresión de CD5 en dichas células (Figura 4.14.B).

Por otro lado, en respuesta al estímulo con PSEx, se observaron variaciones aleatorias en el porcentaje de linfocitos CD3⁺CD5⁺ que podrían deberse al bajo número de estas células (Figura 4.14.A). Sin embargo, resultó interesante la tendencia

observada hacia la disminución en la intensidad de expresión de CD5 en linfocitos CD3⁺ como respuesta al estímulo con concentraciones crecientes de PSEx (Figura 4.14.B).

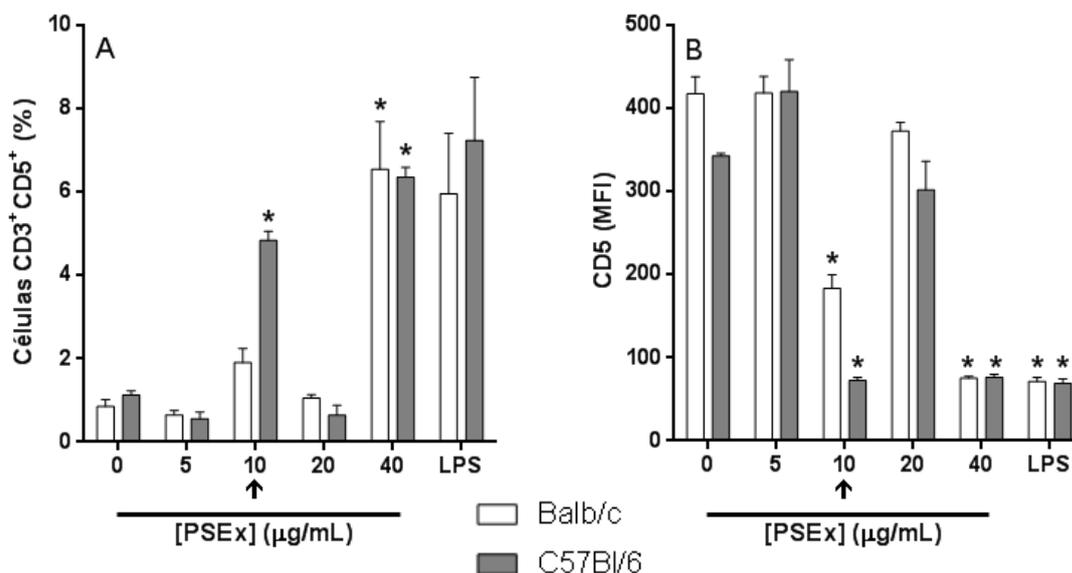


Figura 4.14. Caracterización de las poblaciones CD3⁺CD5⁺ estimuladas con PSEx.

En la figura se muestra el porcentaje de linfocitos CD3⁺CD5⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD5 sobre linfocitos CD3⁺ (B) en cultivos de células peritoneales obtenidas de ratones vírgenes Balb/c y C57Bl/6 estimuladas con PSEx durante 72 horas. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (sin estímulo), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto.

En cuanto a la expresión de CD6 en linfocitos CD3⁺, si bien no se observan diferencias entre cepas de ratones a nivel basal en el porcentaje de células CD3⁺CD6⁺ (Figura 4.15.A), sí se reportó una intensidad de expresión significativamente menor de CD6 sobre dichas células de origen C57Bl/6 (Figura 4.15.B).

Por otro lado, al comparar las células estimuladas con PSEx, se observó una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos CD3⁺CD6⁺ en ambas cepas de ratones, la cual parecería en principio ser independiente de la concentración de PSEx (Figura 4.15.A). Sin embargo, la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD3⁺ mostró un comportamiento diferencial entre cepas de ratones: mientras que el estímulo con PSEx sobre células de origen Balb/c no mostró variaciones, en los linfocitos CD3⁺ de origen C57Bl/6 la misma mostró un aumento significativo con la concentración de

PSEx (Figura 4.15.B). Asimismo, en todas las condiciones ensayadas, la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD3⁺ fue significativamente mayor en células de origen Balb/c (Figura 4.15.B).

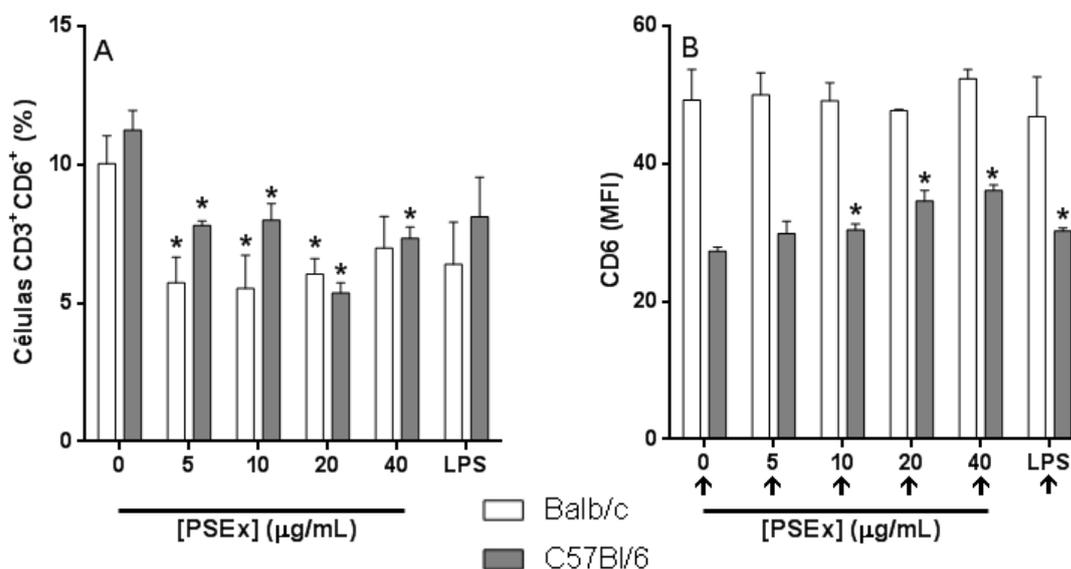


Figura 4.15. Caracterización de las poblaciones CD3⁺CD6⁺ estimuladas con PSEx. En la figura se muestra el porcentaje de linfocitos CD3⁺CD6⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD3⁺ (B) en cultivos de células peritoneales obtenidas de ratones vírgenes Balb/c y C57Bl/6 estimuladas con PSEx durante 72 horas. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (sin estímulo), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto.

4.2.3. Efectos de PSEx sobre la expresión de CD5 y CD6 en linfocitos CD19⁺.

Luego de analizar el perfil de expresión de CD5 y CD6 sobre el compartimiento de linfocitos CD3⁺, se procedió a realizar un estudio análogo sobre los linfocitos CD19⁺. En este sentido, se observó un porcentaje significativamente menor a nivel basal de linfocitos CD19⁺CD5⁺ en células de origen C57Bl/6 (Figura 4.16.A), en línea con nuestros resultados obtenidos previamente *in vivo* (Figura 4.4.A). Asimismo, no se reportaron diferencias significativas entre cepas de ratones en cuanto a la intensidad de expresión de CD5 sobre dichas células (Figura 4.16.B).

Por otro lado, en cuanto a las células estimuladas con PSEx, no se observaron grandes variaciones en ninguna de las cepas de ratones tanto en el porcentaje de linfocitos CD19⁺CD5⁺ (Figura 4.16.A) como en la intensidad de expresión de CD5 sobre dichas células (Figura 4.16.B).

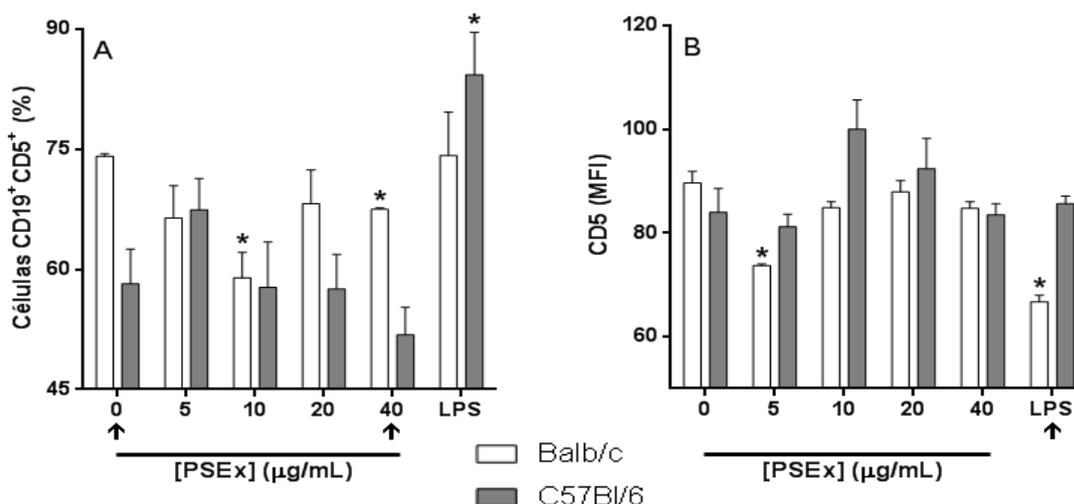


Figura 4.16. Caracterización de las poblaciones CD19⁺CD5⁺ estimuladas con PSEx.

En la figura se muestra el porcentaje de linfocitos CD19⁺CD5⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD5 sobre linfocitos CD19⁺ (B) en cultivos de células peritoneales obtenidas de ratones vírgenes Balb/c y C57Bl/6 estimuladas con PSEx durante 72 horas. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (sin estímulo), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto.

Por último, del análisis de la expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ a nivel basal podemos mencionar que no se observaron diferencias significativas entre cepas en el porcentaje de células CD19⁺CD6⁺ (Figura 4.17.A), pero sí valores significativamente menores de intensidad de expresión de CD6 sobre dichas células de origen C57Bl/6 (Figura 4.17.B), nuevamente en línea con nuestros resultados obtenidos previamente *in vivo* (Figura 4.5.A & B).

En cuanto a las células estimuladas con PSEx, no se observaron grandes variaciones entre cepas en el porcentaje de linfocitos CD19⁺CD6⁺ (Figura 4.17.A). Sin embargo, la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ mostró un comportamiento destacable en ambas cepas de ratones: aumentó significativamente

frente al estímulo con PSEx en forma dosis-dependiente (Figura 4.17.B). Asimismo, la inducción de CD6 en linfocitos CD19⁺ sería más sensible en células provenientes de ratones Balb/c, ya que el efecto inductor se observó a partir de la menor concentración de PSEx ensayada (Figura 4.17.B). Por último, cabe destacar que la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ fue significativamente mayor en células de origen Balb/c, independientemente de la condición de estímulo analizada (Figura 4.17.B).

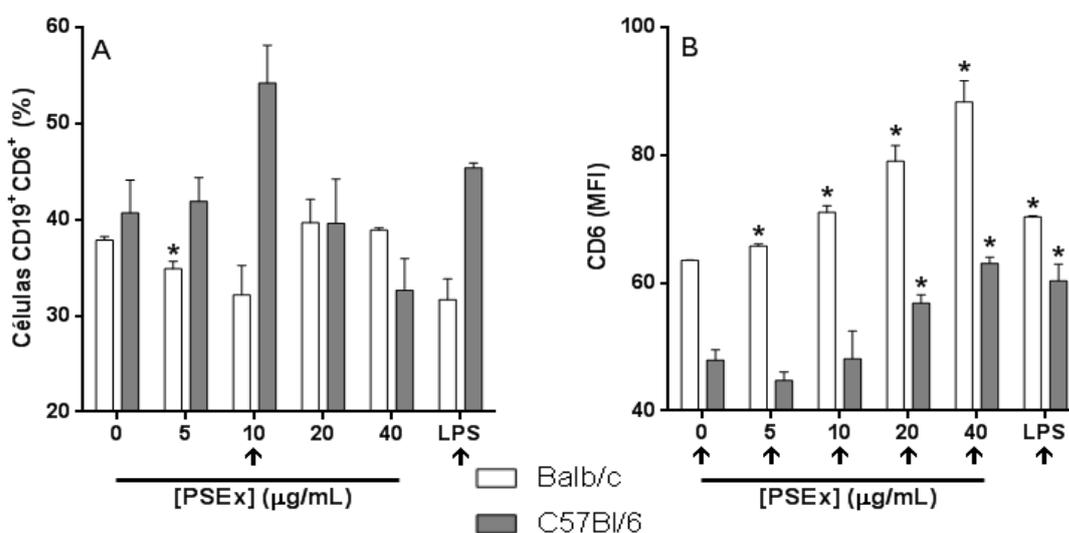


Figura 4.17. Caracterización de las poblaciones CD19⁺CD6⁺ estimuladas con PSEx.

En la figura se muestra el porcentaje de linfocitos CD19⁺CD6⁺ (A) y la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ (B) en cultivos de células peritoneales obtenidas de ratones vírgenes Balb/c y C57Bl/6 estimuladas con PSEx durante 72 horas. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se muestran como asteriscos en la comparación respecto a los valores basales de cada cepa (sin estímulo), y como flechas en la comparación entre cepas para cada punto.

5. DISCUSIÓN

Estudios previos realizados por nuestro grupo mostraron que los ectodominios tanto de CD5 como de CD6, son capaces de unir PSC viables e íntegros, así como PSEx de forma específica y dosis-dependiente, y ese reconocimiento es capaz de modular la producción de citoquinas *in vitro*. A su vez, se observó que la administración de las formas recombinantes de dichos receptores posee un interesante potencial profiláctico en el modelo murino de EQ secundaria [Mourglia-Ettlin *et al.*, manuscrito en preparación].

La relevancia de dichos resultados radica en que, por un lado, son pocos los receptores innatos descritos capaces de reconocer antígenos de parásitos helmintos [Paveley *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2013; Tundup *et al.*, 2015; Ponichtera & Stadecker, 2015; Aldridge & O'Neill, 2016]; y por otro lado, los receptores CD5 y CD6 se expresan en linfocitos B1a, células que serían clave en el desarrollo de infecciones por helmintos al producir anticuerpos naturales polireactivos y actuar como células B con funciones reguladoras (Breg productoras de IL-10) [Fainboim & Geffner, 2011; Sun *et al.*, 2005; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b]. Dichas células se localizan preferentemente en cavidades serosas como la cavidad peritoneal [Fainboim & Geffner, 2011], detalle que puede ser relevante ya que en el modelo en estudio los PSC se inoculan por vía intraperitoneal en ratones inmunocompetentes [Heath, 1970]. Además, está reportado que los ratones de las cepas Balb/c y C57Bl/6 presentan diferencias en el número de células B1a peritoneales [Itakura *et al.*, 2013]. Cabe aclarar que la expresión de estos receptores no está restringida solamente a las células B1a, sino que también son expresados en linfocitos T, otra población celular importante del sistema inmune [Kamoun *et al.*, 1981; Martínez *et al.*, 2011]. Todo ello nos permite sugerir que CD5 y/o CD6 podrían cumplir algún papel en el normal desarrollo de la EQ murina. Por ello, nos propusimos analizar las variaciones en el perfil de expresión de CD5 y CD6 sobre linfocitos de ratones con baja (C57Bl/6) y alta (Balb/c) susceptibilidad a la infección secundaria experimental por *E. granulosus*.

En primer lugar, se realizó un análisis general de leucocitos y linfocitos totales tanto en cavidad peritoneal como en bazo en ambas cepas de ratones. Así, en el contexto de la infección experimental, los ratones de la cepa C57Bl/6 mostraron un aumento significativo en el número de leucocitos peritoneales en todos los puntos temporales analizados (Figura 4.1.A). Asimismo, en dichos ratones se observó un aumento significativo en el número de linfocitos totales en los días 7 y 14 p.i. (Figura 4.1.B) Por

otro lado, en los ratones de la cepa Balb/c, el único aumento significativo reportado a nivel peritoneal ocurrió en el día 14 p.i. (Figura 4.1.A). Este reclutamiento celular local diferencial podría ser, al menos en parte, uno de los fenómenos que explicarían la diferencia en susceptibilidad de ambas cepas frente a la EQ secundaria, ya que las respuestas generadas por el hospedero no son eficientes luego del enquistamiento parasitario (etapa crónica) [Díaz *et al.*, 2011; Rogan *et al.*, 2015]. Por otro lado, y en paralelo, se observó un descenso significativo tanto de leucocitos (Figura 4.6.A) como de linfocitos totales (Figura 4.6.B) a partir del día 14 p.i. en los bazo de ambas cepas de ratones. Este hecho podría sugerir un reclutamiento de células provenientes del bazo hacia el sitio de infección, aunque nuestros resultados no nos permiten ser concluyentes al respecto.

La población de leucocitos denominada linfocitos se compone de compartimientos celulares B, T y NK. A su vez, los linfocitos B y T constan de más una sub-población, siendo para el caso de linfocitos B las células B2/convencionales, B de zona marginal, B1a y B1b; y para el caso de linfocitos T, las células T CD4⁺ (colaboradoras con distintos perfiles, foliculares y/o reguladoras), células T CD8⁺ (citotóxicas) y células NKT [Fainboim & Geffner, 2011].

Respecto a la población de linfocitos CD3⁺ (células T), se observó un comportamiento cinético similar en ambas cepas de ratones: aumento significativo en las dos primeras semanas de infección seguido de un retorno a valores basales sobre la tercer semana (Figura 4.1.C). A su vez, el número de linfocitos CD3⁺ en el día 7 p.i. mostró ser significativamente mayor en ratones de la cepa Balb/c respecto a C57Bl/6 (Figura 4.1.C). Esto último podría ser un hecho a destacar relacionándolo con hallazgos previos reportados por nuestro grupo. En este sentido, Mourglia-Ettlin y cols. (2011), utilizando el mismo modelo de infección encontraron que en cavidad peritoneal de ratones Balb/c aumentan significativamente los niveles de ARNm para FoxP3 a los 5-7 días p.i. [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a]. Dicho marcador se asociaría con la presencia de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), las cuales por sus características inmuno-reguladoras podrían relacionarse con la mayor susceptibilidad a la infección que poseen los ratones Balb/c. En este sentido, las células T reguladoras estarían involucradas en la regulación negativa de las respuestas de tipo Th1, reduciendo las respuestas inflamatorias que dañarían tanto al parásito como a su hospedero en la primera semana de infección. Así, se favorecería indirectamente el desarrollo de respuestas de tipo Th2 y, en última instancia, la sobrevivencia y el desarrollo del parásito. Cabría proponerse caracterizar en profundidad las distintas

subpoblaciones de linfocitos T peritoneales, con especial interés en aquellas con fenotipos reguladores, en la cepa C57Bl/6 durante la etapa temprana de la infección. De esta forma se podría comparar dichos resultados con los previamente reportados para Balb/c. Sumado a esto, en el modelo de EQ secundaria experimental, se ha visto que 5 días p.i. aumenta el número de linfocitos T tanto CD8⁺ como CD4⁺ en ambas cepas de ratones, observándose número significativamente mayores de T CD4⁺ en la cepa Balb/c [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b]. De esta forma, se podría sugerir que si entre esos linfocitos T CD4⁺ existen células T reguladoras, la cantidad que se reclutaría al sitio de infección en Balb/c podría ser mayor que en C57Bl/6, condicionando en cierta medida la susceptibilidad cepa-específica. Nuevamente, nuestros resultados no nos permiten ser concluyentes al respecto, y se debería profundizar a futuro realizando otros experimentos.

Por su parte, el número de linfocitos peritoneales CD3⁺CD5⁺ en ratones Balb/c mostró aumentos significativos en las dos primeras semanas de infección, mientras que en ratones C57Bl/6 sólo se observaron tendencias (Figura 4.2.A). Esta diferencia a favor de la cepa con mayor susceptibilidad a la EQ secundaria podría ser relevante si se tiene en cuenta que CD5 se expresa con mayor intensidad en células B y T con función reguladora, y se postula que dicho receptor actuaría como molécula co-estimuladora en células T maduras [Fenutría *et al.*, 2014].

En cuanto a la intensidad de expresión de CD5 en linfocitos peritoneales CD3⁺, la misma disminuyó en ambas cepas a medida que avanzó la infección, mostrando descensos significativos en las dos últimas semanas de infección en los ratones Balb/c, y en la última semana en los ratones C57Bl/6 (Figura 4.2.B). En el mismo sentido, la expresión de CD6 en linfocitos peritoneales CD3⁺ disminuyó significativamente a lo largo del tiempo en ambas cepas, aunque con mayor velocidad aparente en los ratones Balb/c (Figura 4.3.B). Este fenómeno podría explicarse en base a lo reportado por Carrasco y cols. (2017), quienes, con un modelo *in vitro* de activación por mitógenos de una línea celular T humana, observaron un descenso en la expresión de CD6 de membrana en concomitancia con un aumento de CD6 soluble en los sobrenadantes de cultivo [Carrasco *et al.*, 2017]. En este sentido, ya que se trata de proteínas genética y estructuralmente muy relacionadas, podría pensarse que este efecto sobre la expresión de CD6 ocurriese en forma análoga también sobre CD5. A su vez, Carrasco y cols. (2017) reportaron que las células T reguladoras si bien son CD6⁺, expresan dicho marcador con baja intensidad [Carrasco *et al.*, 2017]. De esta manera, si entre las células CD3⁺CD6⁺ reclutadas existiese gran proporción de células

T reguladoras, esto podría traducirse en un descenso global de la intensidad de expresión de dicho receptor.

Interesantemente, los resultados obtenidos respecto a CD5 en los experimentos *in vivo* se correspondieron con los estudios *in vitro* a partir de células peritoneales vírgenes de ratones C57Bl/6 y Balb/c estimuladas con concentraciones crecientes de PSEx, un extracto de antígenos tegumentarios de PSC. Así, en respuesta al estímulo dosis-dependiente con PSEx se observó una tendencia hacia la disminución en la intensidad de expresión de CD5 en linfocitos CD3⁺ (Figura 4.14.B). Sin embargo, el estímulo dosis-dependiente con PSEx indujo un aumento significativo en la expresión de CD6 sobre linfocitos CD3⁺ de origen C57Bl/6, pero no Balb/c (Figura 4.15.B). Asimismo, en todas las condiciones ensayadas, la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD3⁺ fue significativamente mayor en células de origen Balb/c (Figura 4.15.B). Este fenómeno difiere completamente con lo observado en los experimentos *in vivo* (Figura 4.3.B). Además, cabe destacar que aunque se trató de experimentos completamente distintos, y por ende no resultó pertinente realizar un análisis estadístico entre ellos, la intensidad de expresión de CD6 arrojó sistemáticamente valores menores *in vitro* respecto a los obtenidos en los experimentos *in vivo*, sugiriendo que las condiciones de cultivo *per se* influirían directamente sobre la expresión de estos receptores.

Por su parte, los resultados sobre linfocitos CD3⁺ de bazo mostraron estar en línea con el comportamiento global de los linfocitos totales, es decir, a medida que avanzó la etapa temprana de infección se observaron descensos significativos en su número en ambas cepas de ratones (Figura 4.6.C). Asimismo, se observó un descenso significativo en el número de linfocitos CD3⁺CD5⁺ en todos los puntos temporales analizados y para ambas cepas de ratones (Figura 4.7.A). Una posible hipótesis que podría explicar dicho descenso sería que los mismos hubiesen migrado hacia el sitio de infección, de igual manera a lo planteado para leucocitos y linfocitos totales. En cuanto a los niveles de expresión de CD5 en linfocitos CD3⁺ de bazo, no se observaron grandes variaciones en ninguna cepa en la ventana de tiempo estudiada (Figura 4.7.B).

El análisis de la expresión de CD6 sobre linfocitos CD3⁺ de bazo mostró características particulares. Por un lado, a nivel basal se observó una menor intensidad de expresión en los linfocitos CD3⁺ de origen Balb/c (Figura 4.8.B). Por otro lado, y en forma contraria a lo observado con los linfocitos CD3⁺CD5⁺ (Figura 4.7.), el

número de linfocitos CD3⁺CD6⁺ no mostró grandes variaciones durante la etapa temprana de la infección experimental (Figura 4.8.A), pero el nivel de expresión de CD6 en dicha población mostró aumentos significativos respecto a los valores basales de cada cepa de ratones (Figura 4.8.B). En este sentido, Consuegra-Fernández y cols. (2017) reportaron que los esplenocitos de ratones CD6^{-/-} (en *background* genético C57Bl/6) poseen una capacidad de proliferación reducida y muestran aumentos en la generación de células T reguladoras inducidas, aunque disfuncionales. Así, los autores sugirieron que CD6 cumpliría un papel importante en la inducción y/o funcionalidad de dichas células [Consuegra-Fernández *et al.*, 2017]. Interesantemente, nuestros resultados mostraron que los linfocitos CD3⁺ de origen Balb/c poseen una menor expresión de CD6 respecto a los ratones C57Bl/6, lo cual podría tener efectos sobre el desarrollo de linfocitos T reguladores inducidos en la cepa de mayor susceptibilidad a la EQ secundaria.

Para culminar con el análisis de los linfocitos CD3⁺, se realizó además un análisis comparativo de los valores de intensidad de expresión para CD5 y CD6 entre células de bazo y cavidad peritoneal. En este sentido, los resultados obtenidos mostraron que los niveles de expresión de CD5 fueron mayores a nivel de bazo en ambas cepas de ratones e independientemente del punto temporal analizado (ya sea basal o durante la infección temprana) (Figura 4.11.A & B). Por otro lado, contrariamente a lo que ocurre con CD5 (Figura 4.11.A & B), se observó que los niveles de expresión de CD6 sobre linfocitos CD3⁺ fueron mayores a nivel peritoneal en ambas cepas de ratones tanto a nivel basal como en los días 7 y 14 p.i., invirtiéndose luego la predominancia hacia el bazo (Figura 4.12.A & B). En este sentido, existen reportes para otros receptores donde sus niveles de expresión varían de acuerdo a la ubicación anatómica de la célula. Un ejemplo sería el caso de CD69, un marcador de activación temprana en linfocitos T que participa en los procesos de migración celular [Gregor *et al.*, 2017]. Así, podría sugerirse que el perfil de expresión de CD5 y CD6 podría variar según el patrón de migración de los linfocitos T y/o en función de sus distintos estadios de activación.

Por otro lado, se realizó sobre las poblaciones de linfocitos CD19⁺ (células B) un análisis análogo al de linfocitos CD3⁺. En este sentido, los resultados obtenidos a nivel peritoneal en ratones control (basal) mostraron que el número de linfocitos CD19⁺ en ratones C57Bl/6 fue menor respecto a ratones Balb/c (Figura 4.1.D). Asimismo, los ratones de la cepa C57Bl/6 presentaron un número significativamente menor de linfocitos peritoneales CD19⁺CD5⁺ (linfocitos B1a) en comparación con los ratones

Balb/c (Figura 4.4.A). Este resultado coincide con los hallazgos reportados por Itakura y cols. (2013) quienes mostraron que los ratones C57Bl/6 poseen un número menor de linfocitos B1a en cavidad peritoneal respecto a los ratones de la cepa Balb/c [Itakura *et al.*, 2013]. Esta diferencia sería importante ya que el hecho de que la cepa Balb/c (de alta susceptibilidad) posea un mayor número de linfocitos B1a previo al desarrollo de la EQ secundaria podría tener una correlación con el establecimiento de la misma. Esto podría deberse a que CD5 se expresa con mayor intensidad en células B con función reguladora y actuaría como una molécula de señalización negativa en células B1a maduras [Fenutría *et al.*, 2014]. Sumado a lo anterior, cabe mencionar que los parásitos poseen estrategias de establecimiento mediante evasión y/o modulación de las respuestas del sistema inmune de sus hospederos [Vuitton *et al.*, 2010], y en nuestro caso se ha sugerido que los linfocitos B1 peritoneales jugarían un papel importante a favor de la supervivencia de *E. granulosus* [Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b].

Asimismo, en los ratones Balb/c se observó un descenso significativo del número de linfocitos peritoneales CD19⁺CD5⁺ en el día 21 p.i., haciendo que en dicho punto temporal ambas cepas de ratones muestren diferencias en el número de dichas células (Figura 4.4.A). En el entorno del día 21 p.i. culminaría la etapa temprana de la infección, es decir, se desarrollaría la capa laminar parasitaria y se daría el enquistamiento parasitario. Si bien podría resultar contra intuitivo el descenso numérico de linfocitos B1a peritoneales en la cepa de alta susceptibilidad, se debe tener presente que las células B cumplen un papel dual en la inmunidad anti-parasitaria, actuando tanto en detrimento [Harris & Gause, 2011] como a favor [Amu *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2010] del hospedero. Además, no conocemos el perfil y/o estadio de activación de las células B1a durante la etapa temprana de infección, ni tampoco si los mismos ocurren o no de forma diferente en ambas cepas de ratones. Por último, se observó que el nivel de expresión de CD5 sobre linfocitos CD19⁺ peritoneales desciende durante la infección en ambas cepas de ratones (Figura 4.4.B), lo cual podría deberse a su proteólisis y secreción en forma análoga a lo reportado para el CD6 de las células T [Carrasco *et al.*, 2017].

En lo que respecta a la expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ peritoneales, consideramos importante destacar que en ratones C57Bl/6 la expresión de dicho receptor fue menor a la observada en ratones Balb/c (Figura 4.5.B). Interesantemente, más allá de la diferencia entre cepas, nuestros resultados son contrarios a los reportados por Enyindah-Asonye y cols. (2017). Estos autores observaron que, a diferencia de lo que ocurre en bazo, no existe expresión basal de CD6 sobre células B

peritoneales, sino que dichas células la adquieren una vez emigradas hacia el bazo [Enyindah-Asonye *et al.*, 2017]. En este punto es necesario realizar algunas puntualizaciones. En primer lugar, Enyindah-Asonye y cols. (2017) utilizaron células obtenidas de ratones de la cepa DBA/1, los cuales poseen un *background* genético distinto a las cepas utilizadas por nosotros (Balb/c y C57Bl/6). Además, los anticuerpos que utilizaron para realizar citometría de flujo fueron preparados por ellos mismos, mientras que los nuestros fueron de origen comercial. Por último, los autores no aclaran en qué tipo de bioterio mantuvieron a los animales de experimentación (convencional vs. SPF). Este punto resultaría importante *per se* ya que existe evidencia preliminar que sugiere la variación significativa en la expresión de ciertos receptores celulares -CD6 entre ellos- en función del tipo de bioterio en el que se mantiene a los ratones, posiblemente debido a efectos de interacción hospedero-microbiota [Cristina Català, comunicación personal].

Siguiendo con nuestra descripción de linfocitos CD19⁺ peritoneales que expresan CD6, se observó que durante la etapa temprana de la infección experimental en los ratones C57Bl/6 aumentó en forma sostenida el número de linfocitos CD19⁺CD6⁺ mientras que en los ratones Balb/c dicho aumento ocurrió puntualmente en el día 7 p.i. (Figura 4.5.A). Además, al igual que para el receptor CD5 (Figura 4.4.B), se observó que los niveles de expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ peritoneales disminuyeron significativamente en ambas cepas de ratones a medida que avanzó la infección (Figura 4.5.B). Interesantemente, la magnitud de dicho descenso en la expresión de CD6 fue mayor sobre linfocitos CD19⁺ de origen Balb/c (Figura 4.5.B). Nuevamente, estos descensos quizás se deban a los mismos resultados reportados para células T activadas [Carrasco *et al.*, 2017].

Por otro lado, los resultados obtenidos *in vitro* para linfocitos CD19⁺ peritoneales mostraron nuevamente la existencia de una menor proporción basal de linfocitos CD19⁺CD5⁺ en células de origen C57Bl/6 (Figura 4.16.A), en línea tanto con nuestros resultados obtenidos a nivel basal en los experimentos *in vivo* (Figura 4.4.A) como con lo reportado por Itakura y cols. (2013). Asimismo, el análisis de la expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ a nivel basal mostró que las células de origen C57Bl/6 poseen valores menores de intensidad de expresión de CD6 respecto a las de origen Balb/c (Figura 4.17.B), nuevamente en línea con nuestros resultados obtenidos previamente *in vivo* (Figura 4.5.A & B). Cabe comentar que, aunque se trata de experimentos completamente distintos, la intensidad de expresión de CD6 en cultivo mostró valores menores respecto a lo observado *in vivo*. Interesantemente, el estímulo de dichas

células con PSEx mostró un aumento dosis-dependiente significativo en la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ tanto de origen Balb/c como C57Bl/6 (Figura 4.17.B). Sin embargo, dicha inducción de CD6 sería más sensible en células provenientes de ratones Balb/c, ya que el aumento se observó a partir de la menor concentración de PSEx ensayada (Figura 4.17.B). Asimismo, la intensidad de expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ fue mayor en células de origen Balb/c para todas las condiciones de estímulo con PSEx analizadas (Figura 4.17.B). Es interesante destacar que estos resultados obtenidos *in vitro* no reprodujeron lo observado en los experimentos *in vivo*, es decir, el aumento de expresión de CD6 *in vitro* por estimulación con PSEx es contrario al descenso en expresión observado durante la etapa temprana de infección. Esta discordancia sugeriría que el estudio de la expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ peritoneales es claramente dependiente del sistema de estudio.

En lo que respecta a las células B de bazo, los resultados obtenidos estuvieron en línea con los referidos a linfocitos totales, es decir, a medida que avanzó la etapa temprana de infección se observó un descenso numérico de linfocitos CD19⁺ en ambas cepas de ratones (Figura 4.6.D). Interesantemente, y a diferencia de lo observado para el total de linfocitos CD19⁺, los resultados mostraron un aumento significativo del número de linfocitos CD19⁺CD5⁺ en el bazo de ambas cepas de ratones. Asimismo, dicho aumento fue más sostenido en el tiempo en los ratones C57Bl/6 respecto a lo observado en los Balb/c (Figura 4.9.A). Así, nuestros resultados sugieren que en el contexto de la EQ secundaria experimental ocurre una expansión de linfocitos B1a a nivel de bazo en las etapas tempranas, hallazgos que estarían en línea con reportes existentes para otros modelos de infección por parásitos. En este sentido podemos destacar el trabajo de Velupillai y cols. (1996), en el cual mediante inyección i.p. de huevos de *S. mansoni* (parásito trematodo) en ratones machos CBA/J, se observó proliferación de linfocitos B1 peritoneales y producción de IL-10 por parte de los mismos 10 días p.i. [Velupillai *et al.*, 1996]. Por otro lado, Palanivel y cols. (1996) inyectaron extractos antigénicos de *Leishmania major* (parásito tripanosomátido) y *Brugia malayi* (parásito nematodo) por vía i.p. a ratones machos Balb/c y hembras C57Bl/6, y 10 días p.i. observaron un aumento en el porcentaje de células B peritoneales CD5⁺ en ratones de la cepa Balb/c, pero no así en aquellos de la cepa C57Bl/6. Asimismo, infectaron ratones con *L. major* y 5 semanas p.i. observaron un aumento porcentual de células B CD5⁺ en bazos de ratones Balb/c pero no en aquellos de ratones C57Bl/6 [Palanivel *et al.*, 1996]. Por último, Arcanjo y cols.

(2017) a través de un modelo de infección intravenosa de ratones Balb/c y Balb/XID (deficientes en células B1) con amastigotes de *L. infantum chagasi* (parásito tripanosomátido), reportaron una mejora en la resistencia a la infección en aquellos ratones deficientes en células B1. Esta mejora se evidenció 30 días p.i. observando -entre otros parámetros- una menor esplenomegalia y menor carga parasitaria en los ratones Balb/XID respecto a los Balb/c [Arcanjo et al., 2017]. De esta forma, la literatura existente asocia los fenómenos de expansión en linfocitos B1 con respuestas en detrimento de los hospederos infectados por parásitos. Así, nuestros resultados sobre expansión de células B1a en bazo podría sugerir que los mismos también serían relevantes en el modelo murino de EQ secundaria.

Por otro lado, y al igual que lo realizado para linfocitos CD3⁺, se comparó el nivel de expresión de CD5 y CD6 sobre células CD19⁺ según su localización anatómica. Así, se observó que si bien a nivel basal la intensidad de expresión de CD5 fue mayor en bazo respecto a cavidad peritoneal para ambas cepas de ratones, dicha diferencia básicamente desapareció en el contexto de la etapa temprana de infección experimental (Figura 4.11.C & D). Sin embargo, y a diferencia de lo observado para CD5, los niveles de expresión de CD6 sobre linfocitos CD19⁺ fueron generalmente mayores a nivel peritoneal en ambas cepas de ratones, e independientemente del punto temporal analizado (ya sea basal o durante la infección temprana) (Figura 4.12.C & D). En este sentido, se ha reportado que la expresión de ciertos marcadores en células B, como por ejemplo CD19, afecta la proliferación y adhesión celular de las mismas afectando su patrón migratorio [Wu et al., 2018]. Por lo tanto, podría ser razonable pensar que la variación en los niveles de expresión de CD5 y CD6 sobre linfocitos B según su localización anatómica quizás pudiese asociarse también a diferencias en sus patrones de migración y/o a sus estadios de activación.

6. REFLEXIONES Y COMENTARIOS FINALES

Como consideraciones finales creemos importante destacar algunos impactos del presente trabajo. Por un lado, salvo el reporte reciente de Enyindah-Asonye y cols. (2017), el nuestro sería uno de los pocos estudios existentes sobre caracterización del receptor CD6 sobre células B normales de origen murino, ya que el análisis exhaustivo de la literatura muestra que la información pre-existente ha sido obtenida básicamente a partir de células humanas básicamente de tipo neoplásico [Schuurman *et al.*, 1987; Merson & Brochier, 1988; Allison *et al.*, 1990; Zukerberg *et al.*, 1993; Osorio *et al.*, 1997; Sembries *et al.*, 1999; Brown & Knox-Macaulay, 2003; Alonso *et al.*, 2010].

Por otro lado, mediante un sistema *in vitro* sencillo logramos reproducir varios de los fenómenos observados en el contexto *in vivo* de la etapa temprana de EQ secundaria murina. Esto nos permitiría sugerir que los efectos tempranos observados en la interacción hospedero-parásito sobre los perfiles de expresión de CD5 y CD6 podrían deberse, al menos en parte, al reconocimiento de antígenos presentes en el tegumento parasitario.

Por último, cabe destacar que el presente trabajo es un estudio mayoritariamente descriptivo de caracterización fenotípica para los receptores CD5 y CD6 sobre distintas poblaciones linfocitarias presentes en las cepas de ratones Balb/c y C57Bl/6. En este sentido, las diferencias reportadas no tendrían necesariamente una correlación directa con la susceptibilidad diferencial observada entre dichas cepas frente al desarrollo de la EQ secundaria. Sin embargo, los resultados obtenidos serán un insumo de gran utilidad para el desarrollo de la línea de trabajo nueva que está llevando a cabo nuestro grupo sobre la capacidad de los receptores CD5 y CD6 de actuar como PRR de antígenos provenientes de parásitos helmintos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aceti A., Pennica A., Teggl A., Fondacaro L., Caferro M., Leri O., Tacchi G., Celestino D., Quaranta G., Rosa De F. **IgG subclasses in human hydatid disease: prominence of the IgG4 response.** *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1993; 102: 347-351.
- Al-Qaoud K.M., Abdel-Hafez S.K. **The induction of T helper type 1 response by cytokine gene transfection protects mice against secondary hydatidosis.** *Parasitol.* 2008; 102(6): 1151-5.
- Aldridge A., O'Neill SM. **Fasciola hepatica tegumental antigens induce anergic-like T cells via dendritic cells in a mannose receptor-dependent manner.** *Eur. J. Immunol.* 2016; 46(5): 1180-92.
- Allen J.E., Maizels R.M. **Diversity and dialogue in immunity to helminths.** *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11: 375-388.
- Alonso R., Buors C., Le Dantec C., Hillion S., Pers J.O., Saraux A., Montero E., Marianowski R., Loisel S., Devauchelle V., Youinou P., Renaudineau Y. **Aberrant expression of CD6 on B-cell subsets from patients with Sjögren's syndrome.** *J. Autoimmun.* 2010; 35(4): 336-41.
- Álvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW. **Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans--review of current knowledge.** *Int. J. Parasitol.* 2014; 44(1): 9-18.
- Amri M., Mezioug D., Touil-Boukoffa C. **Involvement of IL-10 and IL-4 in evasion strategies of Echinococcus granulosus to host immune response.** *Eur. Cytokine Netw.* 2009; 20(2): 63-8.
- Amu S., Gjertsson I., Brisslert M. **Functional characterization of murine CD25 expressing B cells.** *Scand. J. Immunol.* 2010; 71: 275-282.
- Anbu K.A., Joshi P. **Identification of a 55 kDa Haemonchus contortus excretory/secretory glycoprotein as a neutrophil inhibitory factor.** *Parasite Immunology.* 2008; 30(1): 23-30 (2008).
- Appelmelk B.J., Van Die I., Van Vliet S.J., Vandenbroucke-Grauls C.M., Geijtenbeek T.B., van Kooyk Y. **Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells.** *Journal of Immunology.* 2003; 170(4): 1635-1659.

Araj G.F., Matossian R.M., Frayha G.J. **The host response in secondary hydatidosis of mice. I. Circulating antibodies.** *Z. Parasitenkd.* 1977; 52(1): 23-30.

Arcanjo A.F., Nico D., de Castro G.M.M., da Silva Fontes Y., Saltarelli P., Decote-Ricardo D., Nunes M.P., Ferreira-Pereira A., Palatnik-de-Sousa C.B., Freire-de-Lima C.G., Morrot A. **Dependency of B-1 Cells in the Maintenance of Splenic Interleukin-10 Producing Cells and Impairment of Macrophage Resistance in Visceral Leishmaniasis.** *Front. Microbiol.* 2017; 8: 978.

Aruffo A., Bowen M.A., Patel D.D., Haynes B.F., Starling G.C., Gebe J.A., Bajorath J. **CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function?** *Immunol. Today.* 1997; 18(10): 498-504.

Atochina O., Daly-Engel T., Piskorska D., McGuire E., Harn D.A. **A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1⁺ macrophages that suppress naive CD4⁺ T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism.** *Journal of Immunology.* 2001; 167(8): 4293-4302.

Barr T.A., Brown S., Ryan G., Zhao J., Gray D. **TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells.** *European Journal of Immunology.* 2007; 37(11): 3040-3053.

Baz A., Hernández A., Dematteis S., Carol H., Nieto A. **Idiotypic modulation of the antibody response of mice to *Echinococcus granulosus* antigens.** *Immunology.* 1995; 84: 350-354.

Baz A., Richieri A., Puglia A., Nieto A., Dematteis S. **Antibody response in CD4-depleted mice after immunization or during early infection with *Echinococcus granulosus*.** *Parasite Immunology.* 1999; 21: 141-150.

Baz A., Ettlín G.M., Dematteis S. **Complexity and function of cytokine responses in experimental infection by *Echinococcus granulosus*.** *Immunobiology.* 2006; 211: 3-9.

Baz A., Carol H., Fernández V., Mourglia-Ettlín G., Nieto A., Orn A., Dematteis S. ***Echinococcus granulosus*: induction of T-independent antibody response against protoscolex glycoconjugates in early experimental infection.** *Exp. Parasitol.* 2008; 119(4): 460-6.

Beardsell P.L., Howell M.J. **Killing of *Taenia hydatigena* oncospheres by sheep neutrophils.** *Parasitol. Res.* 1984; 70: 337-344.

Beyers A.D., Spruyt L.L., Williams A.F. **Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992; 89(7): 2945-9.

Bikah G., Carey J., Ciallella J.R., Tarakhovsky A., Bondada S. **CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells.** Science. 1996; 274(5294): 1906-9.

Bikker F.J., Ligtenberg A.J., End C., Renner M., Blaich S., Lyer S., Wittig R., van't Hof W., Veerman E.C., Nazmi K., de Blicke-Hogervorst J.M., Kioschis P., Nieuw Amerongen A.V., Poustka A., Mollenhauer J. **Bacteria binding by DMBT1/SAG/gp-340 is confined to the VEVLXXXXW motif in its scavenger receptor cysteine-rich domains.** J. Biol. Chem. 2004; 279(46): 47699-703.

Bowdish D.M., Gordon S. **Conserved domains of the class A scavenger receptors: evolution and function.** Immunol. Rev. 2009; 227(1): 19-31.

Boyce, J. A. **Mast cells: Beyond IgE.** J. Allergy Clin. Immunol. 2003; 111: 24-32.

Brännström A., Sankala M., Tryggvason K., Pikkarainen T. **Arginine residues in domain V have a central role for bacteria-binding activity of macrophage scavenger receptor MARCO.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002; 290(5): 1462-9.

Breijo M., Spinelli P., Sim R.B., Ferreira A.M. **Echinococcus granulosus: an intraperitoneal diffusion chamber model of secondary infection in mice.** Exp. Parasitol. 1998; 90(3): 270-6.

Breijo, M., Anesetti G., Martínez L., Sim R.B., Ferreira A.M. **Echinococcus granulosus: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation.** Experimental Parasitology. 2008; 118(2): 188-196.

Brown L.C., Knox-Macaulay H.H. **Analysis of the immunophenotypes of de novo acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in the Sultanate of Oman.** Leuk. Res. 2003; 27(7): 649-54.

Brunetti E., Junghanss T. **Update on cystic hydatid disease.** Curr. Opin. Infect. Dis. 2009; 22(5): 497-502.

Brunetti E., Kern P., Vuitton D.A.; Writing Panel for the WHO-IWGE. **Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans.** Acta Trop. 2010; 114(1):1-16.

Brunetti E., Heller T., Richter J., Kaminstein D., Youkee D., Giordani M.T., Goblirsch S., Tamarozzi F. **Application of Ultrasonography in the Diagnosis of Infectious Diseases in Resource-Limited Settings.** *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2016; 18(2): 6.

Budke C.M., Deplazes P., Torgerson P.R. **Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis.** *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(2): 296-303.

Caldas I.R., Campi-Azevedo A.C., Oliveira L.F.A., Silveira A.M.S., Oliveira R.C., Gazzinelli G. **Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection.** *Acta Tropica.* 2008; 108: 109-17.

Carmo A.M., Castro M.A., Arosa F.A. **CD2 and CD3 associate independently with CD5 and differentially regulate signaling through CD5 in Jurkat T cells.** *J. Immunol.* 1999; 163(8): 4238-45.

Caron G., Duluc D., Frémaux I., Jeannin P., David C., Gascan H., Delneste Y. **Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4⁺ T cells.** *J. Immunol.* 2005; 175(3): 1551-7.

Carrasco E., Escoda C., Alvarez-Fernández C., Sanchez-Palomino S., Carreras E., Gatell J.M., Gallart T., García F., Climent N., Lozano F. **A role for scavenger-like lymphocyte receptor CD6 in HIV-1 viral infection.** *AIDS Res. Hum. Retrov.* 2014; 30(S1): A49-A50 (abstract).

Carrasco E., Escoda-Ferran C., Climent N., Miró-Julià C., Simões I.T., Martínez-Florensa M., Sarukhan A., Carreras E., Lozano F. **Human CD6 Down-Modulation following T-Cell Activation Compromises Lymphocyte Survival and Proliferative Responses.** *Front. Immunol.* 2017; 8: 769.

Castro, G.A. 1996. **Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development.** *Medical Microbiology*, S. Baron, ed. 4^o edn (Galveston, Texas. USA, University of Texas Medical Branch).

Chappell P.E., Garner L.I., Yan J., Metcalfe C., Hatherley D., Johnson S., Robinson C.V., Lea S.M., Brown M.H. **Structures of CD6 and Its Ligand CD166 Give Insight into Their Interaction.** *Structure.* 2015; 23(8): 1426-1436.

Consuegra-Fernández M., Martínez-Florensa M., Aranda F., de Salort J., Armiger-Borràs N., Lozano T., Casares N., Lasarte J.J., Engel P., Lozano F. **Relevance of CD6-Mediated Interactions in the Regulation of Peripheral T-Cell Responses and Tolerance.** *Front. Immunol.* 2017; 8: 594.

Craig P.S. **Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay.** *Parasite Immunol.* 1986; 8(2): 171-88.

Craig P.S. **Echinococcus granulosus: immunodiagnosis and vaccination, a perspective.** *Parassitologia.* 1997; 39(4): 345-7.

Craig P.S., McManus D.P., Lightowers M.W., Chabalgoity J.A., Garcia H.H., Gavidia C.M., Gilman R.H., Gonzalez A.E., Lorca M., Naquira C., Nieto A., Schantz P.M. **Prevention and control of cystic echinococcosis.** *Lancet Infect. Dis.* 2007; 7(6): 385-94.

Cucher M., Mourglia-Ettlin G., Prada L., Costa H., Kamenetzky L., Poncini C., Dematteis S., Rosenzvit M.C. **Echinococcus granulosus pig strain (G7 genotype) protoscoleces did not develop secondary hydatid cysts in mice.** *Vet. Parasitol.* 2013; 193(1-3): 185-92.

Cucher M., Macchiaroli N., Kamenetzky L., Maldonado L., Brehm K., Rosenzvit M.C. **High-throughput characterization of Echinococcus spp. metacestode miRNomes.** *Int. J. Parasitol.* 2015; 45(4): 253-67.

Daeki A.O., Craig P.S., Shambesh, M.K. **IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients.** *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2000; 94: 319-328.

Dai W.J., Hemphill A., Waldvogel A., Ingold K., Deplazes P., Mossmann H., Gottstein B. **Major carbohydrate antigen of Echinococcus multilocularis induces an immunoglobulin G response independent of alphabeta⁺ CD4⁺ T cells.** *Infection and Immunity.* 2001; 69(10): 6074-6083.

Dematteis S., Baz A., Rottenberg M., Fernández C., Örn A., Nieto A. **Antibody and Th1/Th2-type responses in Balb/c mice inoculated with live or dead Echinococcus granulosus protoscoleces.** *Parasite Immunology.* 1999; 21(1): 19-26.

Dematteis S., Rottenberg M., Baz A. **Cytokine response and outcome of infection depends on the infective dose of parasites in experimental infection by Echinococcus granulosus.** *Parasite Immunology.* 2003; 25(4): 189-97.

Dempster R.P., Harrison G.B., Berridge M.V., Heath, D.D. **Echinococcus granulosus: use of an intermediate host mouse model to evaluate sources of protective antigens and a role for antibody in the immune response.** *Int. J. Parasitol.* 1992; 22: 435-441.

Dessaint J.P., Bout D., Wattré P., Capron A. **Quantitative determination of specific IgE antibodies to Echinococcus granulosus and IgE levels in sera from patients with hydatid disease.** Immunology. 1975; 29: 813-823.

Díaz A., Allen J.E. **Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology.** Eur. J. Immunol. 2007; 37(12): 3319-26.

Díaz A., Casaravilla C., Allen J.E., Sim R.B., Ferreira A.M. **Understanding the laminated layer of larval Echinococcus II: immunology.** Trends Parasitol. 2011; 27(6): 264-73.

Enyindah-Asonye G., Li Y., Xin W., Singer N.G., Gupta N., Fung J., Lin F. **CD6 Receptor Regulates Intestinal Ischemia/Reperfusion-induced Injury by Modulating Natural IgM-producing B1a Cell Self-renewal.** J. Biol. Chem. 2017; 292(2): 661-671.

Everts B., Perona-Wright G., Smits H.H., Hokke C.H., Van der Ham A.J., Fitzsimmons C.M., Doenhoff M.J., Van der Bosch J., Mohrs K., Haas H., Mohrs M., Yazdanbakhsh M., Schramm G. **Omega-1, a glycoprotein secreted by Schistosoma mansoni eggs, drives Th2 responses.** Journal of Experimental Medicine. 2009; 206(8): 1673-1680.

Fabriek B.O., van Bruggen R., Deng D.M., Ligtenberg A.J., Nazmi K., Schornagel K., Vloet R.P., Dijkstra C.D., van den Berg T.K. **The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria.** Blood. 2009; 113(4): 887-92.

Fainboim L., Geffner J. 2011. **Introducción a la Inmunología Humana.** Editorial Médica Panamericana S.A.C.F. (Buenos Aires, Argentina).

Fenutría R., Martínez V.G., Simões I., Postigo J., Gil V., Martínez-Florensa M., Sintés J., Naves R., Cashman K.S., Alberola-Ila J., Ramos-Casals M., Soldevila G., Raman C., Merino J., Merino R., Engel P., Lozano F. **Transgenic expression of soluble human CD5 enhances experimentally-induced autoimmune and anti-tumoral immune responses.** PLoS One. 2014; 9(1): e84895.

Ferragut G., Nieto A. **Antibody response of Echinococcus granulosus infected mice: recognition of glucidic and peptidic epitopes and lack of avidity maturation.** Parasite Immunology. 1996; 18(8): 393-402.

Ferreira A.M., Trecu T., Reisin I. **Echinococcus granulosus: study of the in vitro complement activation by protoscoleces by measuring the electric potential difference across the tegumental membrane.** Exp. Parasitol. 1992; 75(3): 259-68.

Filbey K.J., Grainger J.R., Smith K.A., Boon L., van Rooijen N., Harcus Y., Jenkins S., Hewitson J.P., Maizels R.M. **Innate and adaptive type 2 immune cell responses in genetically controlled resistance to intestinal helminth infection.** Immunol. Cell Biol. 2014; 92(5): 436-48.

Freeman M., Ashkenas J., Rees D.J., Kingsley D.M., Copeland N.G., Jenkins N.A., Krieger M. **An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990; 87(22): 8810-4.

Gimferrer I., Farnós M., Calvo M., Mittelbrunn M., Enrich C., Sánchez-Madrid F., Vives J., Lozano F. **The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells.** J Biol. Chem. 2003; 278(10): 8564-71.

Gimferrer I., Calvo M., Mittelbrunn M., Farnós M., Sarrias M.R., Enrich C., Vives J., Sánchez-Madrid F., Lozano F. **Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation.** J. Immunol. 2004; 173(4): 2262-70.

Gough P.J., Gordon S. **The role of scavenger receptors in the innate immune system.** Microbes Infect. 2000; 2(3): 305-11.

Gregor C.E., Foeng J., Comerford I., McColl S.R. **Chemokine-Driven CD4(+) T Cell Homing: New Concepts and Recent Advances.** Adv. Immunol. 2017; 135: 119-181.

Haralabidis S., Karagouni E., Frydas S., Dotsika E. **Immunoglobulin and cytokine profile in murine secondary hydatidosis.** Parasite Immunol. 1995; 17(12): 625-30.

Harris N., Gause W.C. **To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths.** Trends in Immunology. 2011; 32(2): 80-88.

Harvey R.A., Richard A., Harvey P.D., Champe P.C., Fisher B.D. 2007. **Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology**, edn (Lippincott Williams & Wilkins).

Heath D.D. **The development of Echinococcus granulosus larvae in laboratory animals.** Parasitology. 1970; 60(3): 449-56.

Hernández A., Nieto A. **Induction of protective immunity against murine secondary hydatidosis.** Parasite Immunol. 1994; 16(10): 537-544.

Hernández-Pomi A., Borrás-Salvador R., Mir-Gisbert A. **Analysis of cytokine and specific antibody profiles in hydatid patients with primary infection and relapse of disease.** *Parasite Immunol.* 1997; 19: 553-561.

Hoffmann W., Petit G., Schulz-Key H., Taylor D., Bain O., Le Goff L. **Litomosoides sigmodontis in mice: reappraisal of an old model for filarial research.** *Parasitol. Today.* 2000; 16(9): 387-9.

Hokke C.H., Deelder A.M. **Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay.** *Glycoconjugate Journal.* 2001; 18(8): 573-587.

Hotez P.J., Mistry N., Rubinstein J., Sachs J.D. **Integrating neglected tropical diseases into AIDS, tuberculosis, and malaria control.** *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(22): 2086-9.

Hotez P.J., Bethony J.M., Diemert D.J., Pearson M., Loukas A. **Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis.** *Nature Review in Microbiology.* 2010; 8: 814-26.

Hotez P.J., Brindley P.J., Bethony J.M., King C.H., Pearce E.J., Jacobson J. **Helminth infections: the great neglected tropical diseases.** *J. Clin. Invest.* 2008; 118(4): 1311-21.

Hsu C.N., Tseng S.H., Chang S.W., Chen Y. **Strongyloides stercoralis infection in an intestinal transplant recipient.** *Transpl. Infect. Dis.* 2013; 15(4): E139-43.

Hüttner M., Nakao M., Wassermann T., Siefert L., Boomker J.D., Dinkel A., Sako Y., Mackenstedt U., Romig T., Ito A. **Genetic characterization and phylogenetic position of Echinococcus felidis (Cestoda: Taeniidae) from the African lion.** *Int. J. Parasitol.* 2008; 38(7): 861-8.

Ioppolo S., Notargiacomo S., Profumo E., Franchi C., Ortona E., Riganò R., Siracusano A. **Immunological responses to antigen B from Echinococcus granulosus cyst fluid in hydatid patients.** *Parasite Immunol.* 1996; 18: 571-578.

Itakura A., Iikutani M., Takatsu K., Kikuchi Y. **Interleukin-5 plays a key role in mouse strain- dependent susceptibility to contact hypersensitivity through its effects on initiator B cells.** *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2013; 161 Suppl. 2: 98-106.

Jenkins S.J., Allen J.E. **Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes.** *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010: 262609.

Kamoun M., Kadin M.E., Martin P.J., Nettleton J., Hansen J.A. **A novel human T cell antigen preferentially expressed on mature T cells and shared by both well and poorly differentiated B cell leukemias and lymphomas.** J. Immunol. 1981; 127(3): 987-91.

Khabiri A.R., Bagheri F., Assmar M., Siavashi M.R. **Analysis of specific IgE and IgG subclass antibodies for diagnosis of Echinococcus granulosus.** Parasite Immunol. 2006; 28: 357-362.

Koyasu S., Moro K., Tanabe M., Takeuchi T. **Natural helper cells: a new player in the innate immune response against helminth infection.** Adv. Immunol. 2010; 108: 21-44.

Lampropoulou V., Hoehlig K., Roch T., Neves P., Calderón Gómez E., Sweenie C.H., Hao Y., Freitas A.A., Steinhoff U., Anderton S.M., Fillatreau S. **TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity.** J. Immunol. 2008; 180(7): 4763-73.

Lankester A.C., van Schijndel G.M., Cordell J.L., van Noesel C.J., van Lier R.A. **CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex.** Eur. J. Immunol. 1994; 24(4): 812-6.

Lecomte O., Bock J.B., Birren B.W., Vollrath D., Parnes J.R. **Molecular linkage of the mouse CD5 and CD6 genes.** Immunogenetics. 1996; 44(5): 385-90.

Lissandrin R, Tamarozzi F., Piccoli L., Tinelli C., De Silvestri A., Mariconti M., Meroni V., Genco F., Brunetti E. **Factors Influencing the Serological Response in Hepatic Echinococcus granulosus Infection.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 2016; 94(1): 166-71.

Little J.M., Hollands M.J., Ekberg H. **Recurrence of hydatid disease.** World J. Surg. 1988; 12(5): 700-4

Liu D., Lightowlers M.W., Rickard M.D. **Examination of murine antibody response to secondary hydatidosis using ELISA and immunoelectrophoresis.** Parasite Immunol. 1992; 14(3): 239-48.

Liu H., Komai-Koma M., Xu D., Liew F.Y. **Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103(18): 7048-53.

Lozano F., Simarro M., Calvo J., Vilà J.M., Padilla O., Bowen M.A., Campbell K.S. **CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling.** Crit. Rev. Immunol. 2000; 20(4): 347-58.

Lymbery A.J., Jenkins E.J., Schurer J.M., Thompson R.C. **Echinococcus canadensis, E. borealis, and E. intermedius. What's in a name?** Trends. Parasitol. 2015; 31(1): 23-9.

Macaulay A.E., DeKruyff R.H., Goodnow C.C., Umetsu D.T. **Antigen-specific B cells preferentially induce CD4⁺ T cells to produce IL-4.** Journal of Immunology. 1997; 158: 4171-4179.

Macdonald, A.S., Araujo, M.I., Edward, J., and Pearce, E.J. **Immunology of Parasitic Helminth Infections.** Infect. Immun. 2002; 70, 427-433.

Mamuti W., Sako Y., Nakao M., Xiao N., Nakaya K., Ishikawa Y., Yamasaki H., Lightowlers M.W., Ito A. **Recent advances in characterization of Echinococcus antigen B.** Parasitol. 2006; Int. 55: 57-62.

Manzano-Román R., Sánchez-Ovejero C., Hernández-González A., Casulli A., Siles-Lucas M. **Serological Diagnosis and Follow-Up of Human Cystic Echinococcosis: A New Hope for the Future?** Biomed. Res. Int. 2015; 2015: 428205.

Martínez-Florensa M., Consuegra-Fernández M., Martínez V.G., Cañadas O., Armiger-Borràs N., Bonet-Roselló L., Farrán A., Vila J., Casals C., Lozano F. **Targeting of key pathogenic factors from gram-positive bacteria by the soluble ectodomain of the scavenger-like lymphocyte receptor CD6.** J. Infect. Dis. 2014; 209(7): 1077-86.

Martínez V.G., Moestrup S.K., Holmskov U., Mollenhauer J., Lozano F. **The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis.** Pharmacol. Rev. 2011; 63(4): 967-1000.

Martinez V.G., Escoda-Ferran C., Tadeu Simões I., Arai S., Orta Mascaró M., Carreras E., Martínez-Florensa M., Yelamos J., Miyazaki T., Lozano F. **The macrophage soluble receptor AIM/Api6/CD5L displays a broad pathogen recognition spectrum and is involved in early response to microbial aggression.** Cell Mol. Immunol. 2014; 11(4): 343-54.

Mathew G.D., Qualtiere L.F., Neel H.B., Pearson G.R. **IgA antibody, antibody dependent cellular cytotoxicity and prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma.** Int. J. Cancer. 1981; 27: 175-180.

Mayer B., Funke I., Seed B., Riethmüller G., Weiss E. **Expression of the CD6 T lymphocyte differentiation antigen in normal human brain.** J. Neuroimmunol. 1990; 29(1-3): 193-202.

McSorley H.J., Loukas A. **The immunology of human hookworm infections.** *Parasite Immunology.* 2010; 32: 549-59.

Meevissen M.H.J., Yazdanbakhsh M., Hokke C.H. **Schistosoma mansoni egg glycoproteins and C-type lectins of host immune cells: molecular partners that shape immune responses.** *Experimental Parasitology.* 2012; 132: 14–21.

Merson A., Brochier J. **Phenotypic heterogeneity of B cell chronic lymphocytic leukaemia.** *Immunol. Lett.* 1988; 19(4): 269-71.

Allison M.C., Poulter L.W., Dhillon A.P., Pounder R.E. **Immunohistological studies of surface antigen on colonic lymphoid cells in normal and inflamed mucosa. Comparison of follicular and lamina propria lymphocytes.** *Gastroenterology.* 1990; 99(2):421-30.

Mottaghian H., Saidi F. **Postoperative recurrence of hydatid disease.** *Br J Surg.* 1978; 65(4):237-42.

Morel P., Robert J., Rohner A. **Surgical treatment of hydatid disease of the liver: a survey of 69 patients.** *Surgery.* 1988; 104(5): 859-62.

Moro P.L., Caverio C.A., Tambini M., Briceño Y., Jiménez R., Cabrera L. **Identification of risk factors for cystic echinococcosis in a periurban population of Peru.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(1): 75-8.

Moro P., Schantz P.M. **Echinococcosis: a review.** *International Journal of Infectious Diseases.* 2009; 13: 125-133.

Mourglia-Ettlín G., Marqués J.M., Chabalgoity J.A., Dematteis S. **Early Peritoneal Immune Response during Echinococcus granulosus establishment Displays a Biphasic Behavior.** *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2011a; 5(8): e1293.

Mourglia-Ettlín G., Amezcua-Vesely M.C., Fraga R., Baz A., Merino M.C., Gruppi A., Dematteis S. **Echinococcus granulosus glycoconjugates induce peritoneal B cell differentiation into antibody-secreting cells and cytokine production.** *Parasite Immunology.* 2011b; 33(11): 621-631.

Mourglia-Ettlín G., Cucher M., Arbildi P., Rosenzvit M., Dematteis S. **Natural and induced antibodies contribute to differential susceptibility to secondary cystic echinococcosis of Balb/c and C57Bl/6 mice.** *Immunobiology.* 2016a; 221(1): 103-15.

Mourglia-Ettlin G., Merlino A., Capurro R., Dematteis S. **Susceptibility and resistance to *Echinococcus granulosus* infection: Associations between mouse strains and early peritoneal immune responses.** Immunobiology. 2016b; 221(3): 418-26.

Mourglia-Ettlin G., Miles S., Velasco-De-Andrés M., Armiger-Borràs N., Cucher M.A., Dematteis S., Lozano F. **CD5 and CD6 ectodomains interact with *Echinococcus granulosus* tegumental antigens and protect mice against secondary hydatidosis.** 2018 (manuscrito en preparación).

Nakao M., Yanagida T., Okamoto M., Knapp J., Nkouawa A., Sako Y., Ito A. **State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis.** Infect Genet. Evol. 2010; 10(4): 444-52.

Nakao M., Lavikainen A., Yanagida T., Ito A. **Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae).** Int. J. Parasitol. 2013; 43(12-13): 1017-29.

Neill, D.R., and McKenzie, A.N.J. (2011). **Nuocytes and beyond: New insights into helminth expulsion.** Trends Parasitol. 2013; 27: 214-221.

Nimmerjahn F., Ravetch J.V. **Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding.** Science. 2005; 310(5753): 1510-1512.

Nimmerjahn F., Ravetch J.V. **Fc-gamma receptors: old friends and new family members.** Immunity. 2006; 24(1): 19-28.

Osorio L.M., De Santiago A., Aguilar-Santelises M., Mellstedt H., Jondal M. **CD6 ligation modulates the Bcl-2/Bax ratio and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis induced by anti-IgM.** Blood. 1997; 89(8): 2833-41.

Padilla O., Calvo J., Vilà J.M., Arman M., Gimferrer I., Places L., Arias M.T., Pujana M.A., Vives J., Lozano F. **Genomic organization of the human CD5 gene.** Immunogenetics. 2000; 51(12): 993-1001.

Pagana, K.D., and Pagana, T.J. **Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests.** St. Louis, Mo.: Mosby/Elsevier. 2010.

Palanivel V., Posey C., Horauf A.M., Solbach W., Piessens W.F., Harn D.A. **B-cell outgrowth and ligand-specific production of IL-10 correlate with Th2 dominance in certain parasitic diseases.** Exp. Parasitol. 1996; 84(2): 168-77.

Paveley R.A., Aynsley S.A., Turner J.D., Bourke C.D., Jenkins S.J., Cook P.C., Martinez-Pomares L., Mountford A.P. **The Mannose Receptor (CD206) is an**

important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN γ production. *Int. J. Parasitol.* 2011; 41(13-14): 1335-45.

Pearce E.J., M. Kane C., Sun J., J. Taylor J., McKee A.S., Cervi L. **Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*.** *Immunol. Rev.* 2004; 201: 117-26.

Piccoli L., Tamarozzi F., Cattaneo F., Mariconti M., Filice C., Bruno A., Brunetti E. **Long-term sonographic and serological follow-up of inactive echinococcal cysts of the liver: hints for a "watch-and-wait" approach.** *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(8): e3057.

Pinon J.M., Poirriez J., Lèpan H., Geers R., Penna R., Fernandez D. **Value of isotypic characterization of antibodies to *Echinococcus granulosus* by enzyme-linked immunofiltration assay.** *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1987; 6: 291-295.

Ponichtera H.E., Stadecker M.J. **Dendritic cell expression of the C-type lectin receptor CD209a: A novel innate parasite-sensing mechanism inducing Th17 cells that drive severe immunopathology in murine schistosome infection.** *Exp. Parasitol.* 2015; 158: 42-7.

Pullen G.R., Fitzgerald M.G., Hosking C.S. (1986). **Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution.** *J. Immunol.* 1986; Methods 86: 83-87.

Resnick D., Chatterton J.E., Schwartz K., Slayter H., Krieger M. **Structures of class A macrophage scavenger receptors. Electron microscopic study of flexible, multidomain, fibrous proteins and determination of the disulfide bond pattern of the scavenger receptor cysteine-rich domain.** *J. Biol. Chem.* 1996; 271(43): 26924-30.

Richards K.S., Arme C., Bridges J.F. ***Echinococcus granulosus equinus*: an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cysts.** *Parasitology.* 1983; 86: Pt3 407-417.

Riganò R., Profumo E., Di Felice G., Ortona E., Teggi A., Siracusano A. **In vitro production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients.** *Clin. Exp. Immunol.* 1995a; 99: 433-439.

Riganò R., Profumo E., Ioppolo S., Notargiacomo S., Ortona E., Teggi A., Siracusano, A. **Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease.** *Clin. Exp. Immunol.* 1995b; 102: 281-285.

Riganò R., Profumo E., Teggi A., Siracusano A. **Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with Echinococcus granulosus infection.** Clin. Exp. Immunol. 1996; 105: 456-459.

Riganò R., Profumo E., Ioppolo S., Notargiacomo S., Teggi A., Siracusano A. **Serum cytokine detection in the clinical follow up of patients with cystic echinococcosis.** Clin Exp Immunol. 1999a; 115(3):503-7.

Riganò R., Profumo E., Buttari B., Teggi A., Siracusano A. **Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pharmacologically treated cystic echinococcosis.** Clin Exp Immunol. 1999b; 118(1):95-101.

Riganò R., Profumo E., Bruschi F., Carulli G., Azzarà A., Buttari B., Ortona E., Margutti P., Teggi A., Azzara A. **Modulation of Human Immune Response by Echinococcus granulosus Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses.** Infect. Immun. 2001; 69: 288-296.

Riley E.M., Dixon J.B., Kelly D.F., Cox D.A. **Immune response to Echinococcus granulosus: histological and immunocytochemical observations.** Ann. Trop. Med. Parasitol. 1984; 78(3): 210-2.

Rinaldi F., De Silvestri A., Tamarozzi F., Cattaneo F., Lissandrin R., Brunetti E. **Medical treatment versus "Watch and Wait" in the clinical management of CE3b echinococcal cysts of the liver.** BMC Infect. Dis. 2014; 14: 492.

Rogan M.T., Craig P.S., Zehyle E., Masinde G., Wen H., Zhou P. **In vitro killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera from hydatid endemic areas.** Acta Trop. 1992; 51: 291-296.

Rogan M.T. **T-cell activity associated with secondary infections and implanted cysts of Echinococcus granulosus in BALB/c mice.** Parasite Immunol. 1998; 20(11): 527-33.

Rogan M.T., Bodell A.J., Craig P.S. **Post-encystment/established immunity in cystic echinococcosis: is it really that simple?** Parasite Immunol. 2015; 37: 1-9.

Rosenzvit M.C., Zhang L.H., Kamenetzky L., Canova S.G., Guarnera E.A., McManus D.P. **Genetic variation and epidemiology of Echinococcus granulosus in Argentina.** Parasitology. 1999; 118(Pt 5): 523-30.

Saimot A.G. **Medical treatment of liver hydatidosis.** World J. Surg. 2001; 25(1): 15-20.

Sanjurjo L., Aran G., Roher N., Valledor A.F., Sarrias M.R. **AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease.** J. Leukoc. Biol. 2015; 98(2): 173-84.

Sarhan M.A., Pham T.N., Chen A.Y., Michalak T.I. **Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5.** J. Virol. 2012; 86(7): 3723-35.

Sarrias M.R., Grønlund J., Padilla O., Madsen J., Holmskov U., Lozano F. **The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system.** Crit. Rev. Immunol. 2004; 24(1): 1-37.

Sarrias M.R., Roselló S., Sánchez-Barbero F., Sierra J.M., Vila J., Yélamos J., Vives J., Casals C., Lozano F. **A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor.** J. Biol. Chem. 2005; 280(42): 35391-8.

Sarrias M.R., Farnós M., Mota R., Sánchez-Barbero F., Ibáñez A., Gimferrer I., Vera J., Fenutría R., Casals C., Yélamos J., Lozano F. **CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007; 104(28): 11724-9.

Schiller C.F. **Complications of echinococcus cyst rupture.** A study of 30 cases. JAMA. 1966; 195(3): 220-2.

Schuurman H.J., van Baarlen J., Huppes W., Lam B.W., Verdonck L.F., van Unnik J.A. **Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphoma. Lack of correlation between immunophenotype and cell morphology.** Am. J. Pathol. 1987; 129(1): 140-51.

Sembries S., Pahl H., Stilgenbauer S., Döhner H., Schriever F. **Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion.** Blood. 1999; 93(2): 624-31.

Sestak K., Ward L.A., Sheoran A., Feng X., Akiyoshi D.E., Ward H.D., Tzipori S. **Variability among Cryptosporidium parvum genotype 1 and 2 immunodominant surface glycoproteins.** Parasite Immunology. 2002; 24(4): 213-219.

Severi M.A., Ferragut G., Nieto A. **Antibody response of Echinococcus granulosus infected mice: protoscolex specific response during infection is associated with decreasing specific IgG1/IgG3 ratio as well as decreasing avidity.** Parasite Immunol. 1997; 19(12):545-52.

Shambesh M.K., Craig P.S., Wen H., Rogan M.T., Paolillo E. **IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients.** Acta Trop. 1997; 64: 53-63.

Siracusano A., Teggi A., Ortona E. **Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives.** Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2009; 2009: 474368.

Sterla S., Sato H., Nieto A. **Echinococcus granulosus human infection stimulates low avidity anticarbohydrate IgG2 and high avidity antipeptide IgG4 antibodies.** Parasite Immunol. 1999; 21: 27-34.

Sun C.M., Deriaud E., Leclerc C., Loman R. **Upon TLR9 signaling, CD5⁺ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs.** Immunity. 2005; 22: 467-477.

Tamarozzi F., Mariconti M., Neumayr A., Brunetti E. **The intermediate host immune response in cystic echinococcosis.** Parasite Immunol. 2016; 38(3):170-81.

Tarakhovsky A., Kanner S.B., Hombach J., Ledbetter J.A., Müller W., Killeen N., Rajewsky K. **A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection.** Science. 1995; 269(5223): 535-7.

Taylor M.D., van der Werf N., Maizels R.M. **T cells in helminth infection: The regulators and the regulated.** Trends. Immunol. 2012; 33: 181-189.

Teggi A., Lastilla M.G., De Rosa F. **Therapy of human hydatid disease with mebendazole and albendazole.** Antimicrob. Agents Chemother. 1993; 37(8): 1679-84.

Terrazas L.I., Walsh K.L., Piskorska D., McGuire E., Harn D.A. Jr. **The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1⁺ cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4⁺ cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections.** Journal of Immunology. 2001; 167(9): 5294-5303.

Terrazas L.I. **The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts.** Curr. Top Med. Chem. 2008; 8(5): 383-92.

Thompson R.C.A., Lymbery A.J. 1995. **Echinococcus and Hydatid Disease.** CAB International, Wallingford, pp. 1-50.

Thompson RC. **The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus.** Exp Parasitol. 2008; 119(4): 439-46.

Tundup S., Srivastava L., Norberg T., Watford W., Harn D. **A Neoglycoconjugate Containing the Human Milk Sugar LNFP III Drives Anti-Inflammatory Activation of Antigen Presenting Cells in a CD14 Dependent Pathway.** PLoS One. 2015; 10(9): e0137495.

Velupillai P., Harn D.A. **Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets.** Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994; 91(1): 18-22.

Velupillai P., Sypek J., Harn D.A. **Interleukin-12 and -10 and gamma interferon regulate polyclonal and ligand-specific expansion of murine B-1 cells.** Infect. Immun. 1996; 64(11): 4557-60.

Vera J., Fenutría R., Cañadas O., Figueras M., Mota R., Sarrias M.R., Williams D.L., Casals C., Yelamos J., Lozano F. **The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009; 106(5): 1506-11.

Vuitton D.A., Gottstein B. **Echinococcus multilocularis and its intermediate host: a model of parasite-host interplay.** J. Biomed. Biotechnol. 2010; 2010: 923193.

Walker M., Baz A., Dematteis S., Stettler M., Gottstein B., Schaller J., Hemphill A. **Isolation and characterization of a secretory component of Echinococcus multilocularis metacestodes potentially involved in modulating the host-parasite interface.** Infect. Immun. 2004; 72 (1): 527-536.

Wen H., Craig P.S. **Immunoglobulin G Subclass Responses in Human Cystic and Alveolar Echinococcosis.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 1994; 51: 741-748.

Wilson M.S., Taylor M.D., O’Gorman M.T., Balic A., Barr T. A., Filbey K., Anderton S.M., Maizels R.M. **Helminth-induced CD19⁺CD23^{hi} B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation.** Eur. J. Immunol. 2010; 40: 1682-1696.

Wiria A.E., Djuardi Y., Supali T., Sartono E., Yazdanbakhsh M. **Helminth infection in populations undergoing epidemiological transition: a friend or foe?** Semin. Immunopathol. 2012; 34(6): 889-901.

Wright V., Bickle Q. **Immune responses following experimental human hookworm infection.** Clin. Exp. Immunol. 2005; 142: 398-403.

Wu J., Liang B., Qian Y., Tang L., Xing C., Zhuang Q., Shen Z., Jiang S., Yu K., Feng J. **Down-regulation of CD19 expression inhibits proliferation, adhesion, migration**

and invasion and promotes apoptosis and the efficacy of chemotherapeutic agents and imatinib in SUP-B15 cells. Cell Biol Int. 2018. doi: 10.1002/cbin.10994

Xiao N., Qiu J., Nakao M., Li T., Yang W., Chen X., Schantz P.M., Craig P.S., Ito A. **Echinococcus shiquicus n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China.** Int. J. Parasitol. 2005; 35(6): 693-701.

Yanaba K., Bouaziz J.D., Matsushita T., Tsubata T., Tedder T.F. **The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals.** J. Immunol. 2009; 82: 7459-7472.

Yang Y.R., Sun T., Li Z., Zhang J., Teng J., Liu X., Liu R., Zhao R., Jones M.K., Wang Y., Wen H., Feng X., Zhao Q., Zhao Y., Shi D., Bartholomot B., Vuitton D.A., Pleydell D., Giraudoux P., Ito A., Danson M.F., Boufana B., Craig P.S., Williams G.M., McManus D.P. **Community surveys and risk factor analysis of human alveolar and cystic echinococcosis in Ningxia Hui Autonomous Region, China.** Bull World Health Organ. 2006; 84(9): 714-21.

Zhang W., Li J., Mcmanus D.P. **Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease.** Clin. Microbiol. Rev. 2003; 16: 18-36.

Zhang W., Wen H., Li J., Lin R., McManus, D.P. **Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update.** Clin. Dev. Immunol. 2012; 101895.

Zimmerman A.W., Joosten B., Torensma R., Parnes J.R., van Leeuwen F.N., Figdor C.G. **Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells.** Blood. 2006; 107(8): 3212-20.

Zukerberg L.R., Medeiros L.J., Ferry J.A., Harris N.L. **Diffuse low-grade B-cell lymphomas. Four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features.** Am. J. Clin. Pathol. 1993; 100(4): 373-85.