



Estudio de la función inmunomoduladora de los eosinófilos durante la infección por *F. hepatica*

Lic. Sofía Frigerio Liddle

Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología

Orientadora: Dra. Teresa Freire

Facultad de Medicina

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Marzo 2020

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Teresa por su orientación, comprensión y dedicación de todos estos años. Gracias por siempre motivarme y estar ahí para cualquier duda o pregunta, y por aconsejarme para decidir el camino a seguir. Muchas gracias por escucharme y por tu paciencia, especialmente en este último año algo difícil. Gracias por dedicar tu tiempo a analizar conmigo resultados y posibles experimentos para mejorar el trabajo. De verdad agradezco el hecho de que siempre estés ahí y tengas una palabra para cada uno de nosotros.

También quiero agradecer a mis compañeros y amigos del laboratorio; Flor, Vale, Santi, Moni, Meche, Nati y Pablo. Gracias por hacer divertidos los días en el laboratorio, y también por siempre prestar su ayuda cuando se necesitaba, y apoyarme en momentos difíciles.

Gracias, también, a Steffen Härtel y Jorge Toledo del Laboratorio de Análisis de Imágenes Científicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Muchas gracias por recibirme en su laboratorio, y por su excelente disposición para enseñarme nuevas técnicas así como el funcionamiento de los equipos. Gracias también a todos los demás integrantes del laboratorio, ya que todos me enseñaron algo.

A Paula de la plataforma UBC Pasteur y Mariana de Biofísica (Facultad de Medicina). Les agradezco su buena disposición cuando fue necesario quedarse muchas horas sorteando células o adquiriendo imágenes.

A Pablo Liddle, por sus consejos científicos y por siempre apoyarme y orientarme en momentos de duda.

Por último, pero no menos importante, les agradezco a las agencias que financiaron este trabajo así como la pasantía que se realizó durante el mismo: Comisión Académica de Posgrado (CAP) y Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

Resumen

Los eosinófilos, leucocitos clasificados como granulocitos, participan en diferentes patologías, principalmente en las infecciones por parásitos multicelulares y en las reacciones de hipersensibilidad. Sin embargo, recientemente se le han adjudicado nuevas funciones, como la reparación de tejidos, regulación del metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo, o supresión de las respuestas de tipo Th1 y Th17. En el contexto de una infección helmíntica, en algunos casos los eosinófilos contribuyen a la inducción de respuestas efectivas, aunque en otras se desconoce su participación. En este trabajo, abordamos el estudio de la capacidad inmunomoduladora de los eosinófilos durante la infección por *Fasciola hepatica*, un trematodo que causa importantes pérdidas económicas en la producción pecuaria de nuestro país. Encontramos que hay un considerable reclutamiento de eosinófilos en el hígado de ratones infectados (30%) así como en la cavidad peritoneal (50%). El reclutamiento de estas células, definidas como Siglec-F⁺ F4/80^{int}, aumenta con la gravedad de la infección. Los eosinófilos presentes en el PEC e hígado de animales infectados fueron caracterizados, y se observó que los mismos expresan altos niveles de Siglec-F, CCR3, Ly6G, CD11b, Sirp- α , CD44 y CD162. Observamos una expresión diferencial de algunos de estos marcadores en eosinófilos hepáticos con respecto a eosinófilos del PEC, expresando los primeros mayores niveles de Ly6G, CD11b, CD44 y CD162, lo cual se asocia con un mayor estado de activación. En este trabajo también investigamos posibles mecanismos efectores que los eosinófilos podrían estar realizando durante la infección por *F. hepatica*. Encontramos que los eosinófilos del PEC de animales infectados poseen una mayor expresión de ROS, y que BM-Eos degranulan en presencia de suero de animales infectados y extracto parasitario (FhTE), sugiriendo un posible mecanismo de ADCC. Para detectar la influencia de los eosinófilos en la respuesta inmune adaptativa, realizamos una depleción de las células Siglec-F⁺ en animales infectados. Nuestros resultados muestran que los eosinófilos contribuyen a la inducción de una respuesta inmune adaptativa más efectiva contra *F. hepatica*, dado que su depleción se asoció con mayor daño hepático. Por otro lado, los animales infectados y depletados de eosinófilos presentaron mayor frecuencia de linfocitos T reguladores productores de IL-10 en el hígado y esplenocitos estimulados con antígenos parasitarios produjeron mayores niveles de IL-10 y menores de IL-4 e IL-5. La inmunidad humoral se vio también afectada en los animales depletados de eosinófilos, los cuales presentaron un aumento en los anticuerpos IgG e IgG1. Por otra parte, evaluamos la capacidad de los eosinófilos de regular la respuesta T *in vitro*. Observamos que eosinófilos de animales infectados inhiben la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Sin embargo, no se observaron cambios en el porcentaje de linfocitos T al depletar a los eosinófilos, indicando que los mismos no controlan la proliferación *in vivo* de los linfocitos T durante la infección parasitaria. En resumen, en este trabajo se evidenció que los eosinófilos poseen un rol inmunomodulador en la infección por *Fasciola hepatica*, afectando la inducción de la inmunidad adaptativa, tanto a nivel celular como humoral.

Lista de Abreviaturas

- AAM:** Macrófago alternativamente activado (del inglés, *Alternative Activated Macrophage*)
- ALT:** Alanina-Transaminasa
- ATP:** Adenosín trifosfato (del inglés, *adenosine triphosphate*)
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ADCC:** Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (del inglés, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*)
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- APC:** Célula presentadora de antígeno (del inglés, *antigen-presenting cell*)
- APC:** Alocianina (del inglés *AlloPhycoCyanin*)
- BCA:** Ácido bicinónico (del inglés, *bicinonic acid*)
- BSA:** Seroalbúmina bovina (del inglés, *Bovine seroalbumine*)
- BM-Eos:** Eosinófilos derivados de la médula ósea
- CHEA:** Comisión Honoraria de Experimentación Animal
- CLC:** Cristales de Charcot-Leyden (del inglés, *Charcot-Leyden crystals*)
- CLR:** Receptor lectina de tipo C (del inglés, *C-type lectin-like receptor*)
- CMP:** Progenitor mielóide común (del inglés, *common myeloid progenitor*)
- DC:** Célula dendrítica (del inglés, *dendritic cell*)
- DILAVE:** División de Laboratorios Veterinarios
- EAE:** Encefalomiелitis autoinmune experimental
- Ear:** Ribonucleasa asociada al eosinófilo (del inglés, *Eosinophil-associated Ribonuclease*)
- ECP:** Proteína catiónica del eosinófilo (del inglés, *Eosinophil Cationic Protein*)
- EDN:** Neurotoxina derivada del eosinófilo (del inglés, *Eosinophil-derived neurotoxin*)
- EET:** Trampa extracelular del eosinófilo (del inglés, *Eosinophil Extracellular Trap*)
- EoP:** Progenitor comprometido hacia el linaje eosinofílico (del inglés, *eosinophil-lineage committed progenitor*)
- EPO:** Peroxidasa del eosinófilo (del inglés, *eosinophil peroxidase*)
- ELISA:** Enzimoimmunoensayo (del inglés, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)
- FhTE:** Extracto total de *F. hepatica*
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína (del inglés, *Fluorescein IsoThioCyanate*)
- FLT3-L:** Citoquina (del inglés, *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*)
- Foxp3:** Factor de transcripción (del inglés, *Forkhead box P3*)
- GM-SCF:** Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés, *Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor*)
- HLA-DR:** Antígeno leucocitario humano (del inglés, *Human Leukocyte Antigen*)
- ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule-1*)
- IFN- γ :** Interferón gama
- IgE:** Inmunoglobulina de clase E
- IgG:** Inmunoglobulina de clase G
- IgM:** Inmunoglobulina de clase M
- IgA:** Inmunoglobulina de clase A
- IL:** Interleuquina
- ILC:** Célula linfóide innata (del inglés, *innate lymphoid cell*)
- INAC:** Instituto Nacional de Carnes
- INIA:** Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
- LTC:** Linfocito T citotóxico
- Linfocito NK:** Linfocito NK (del inglés, *Natural Killer*)

MBP: Proteína básica mayor (del inglés, *Major Basic Protein*)
MDSC: Célula supresora mieloides (del inglés, *Myeloid-derived Suppressor Cell*)
MHC: Complejo molecular de histocompatibilidad (del inglés, *molecular histocompatibility complex*)
MPO: Mieloperoxidasa
NEJ: Juvenil recién desenquistado (del inglés, *newly encysted juvenile*)
NET: Trampa extracelular del neutrófilo (del inglés, *Neutrophil Extracellular Trap*)
NLR: Receptor de tipo NOD (del inglés, *NOD-like receptor*)
PAMP: Patrón molecular asociado a patógeno (del inglés, *pathogen-associated molecular pattern*)
PBS: Buffer fosfato salino (del inglés, *phosphate saline buffer*)
PE:Ficoeritrina (del inglés, *PhycoEritrin*)
PEC: Célula del exudado peritoneal (del inglés, *peritoneal exudated cell*)
PMD: Degranulación fragmentada (del inglés, *Piecemeal Degranulation*)
PRR: Receptor de reconocimiento de patrones (del inglés, *pattern-recognition receptor*)
PSGL-1: Ligando de P-selectina (del inglés, *P-selectin glycoprotein ligand-1*)
qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (del inglés, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*).
RLR: Receptor de tipo RIG-I (del inglés, *RIG-I like receptor*)
RNS: Especies reactivas del nitrógeno (del inglés, *reactive nitrogen species*)
RORyt: Factor de transcripción (del inglés *RAR-related orphan receptor gamma*)
ROS: Especies reactivas del oxígeno (del inglés, *reactive oxigen species*)
RPMI: Medio del Instituto Roswell Park (del inglés, *Roswell Park Memorial Institute Medium*)
SCF: Citoquina (del inglés, *stem cell factor*)
SFB: Suero fetal bovino
STAT: Factor de transcripción (del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription*).
TGF-β: Factor de Crecimiento Transformante beta (del inglés, *Transforming Growth Factor beta*)
TLR: Receptor de tipo Toll (del inglés, *Toll-like receptor*)
Tm: Temperatura de melting
TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *Tumor Necrosis Factor alfa*)
URBE: Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación
VCAM-1: Molécula de adhesión vascular (del inglés, *vascular cell adhesion molecule 1*)
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

Índice de contenidos

1. Introducción	1
Fasciola hepatica y fasciolosis	1
Generalidades sobre los parásitos helmintos	1
Fasciolosis	2
Fasciolosis en Uruguay	3
Agente causal y ciclo de vida	4
Control y tratamiento	6
Sistema Inmune	7
Características generales	7
Activación de linfocitos T cooperadores y diferenciación hacia subtipos efectores	8
Respuesta inmune frente a parásitos helmintos	10
Eosinófilos	12
Características generales	12
Diferenciación	14
Moléculas expresadas	15
Reclutamiento	16
Activación	18
Funciones efectoras clásicas	19
Funciones moduladoras	20
Papel de los eosinófilos en infecciones por parásitos helmintos	22
Función de los eosinófilos durante la fasciolosis	25
Eosinófilos en el hígado: función en fibrosis y reparación del tejido	26
Hipótesis	28
Objetivo General	28
Objetivos Específicos	28
2. Materiales y Métodos	29
• Modelo murino de infección por <i>F. hepatica</i>	29
• Evaluación del daño hepático	30
• Obtención de suspensiones celulares de esplenocitos y leucocitos hepáticos	30
• Preparación de lisados de <i>F. hepatica</i>	31
• Cuantificación de proteínas	31
• Extracción de ARN, cuantificación y medida de pureza	31
• Síntesis de ADN copia (ADNc)	32
• Determinación de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	33
• Análisis de leucocitos por citometría de flujo	33
• Estudio de la morfología de eosinófilos por tinción May Grunwald Giemsa	35

• Análisis de leucocitos por inmunofluorescencia	35
• Detección de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS/RNS) por citometría de flujo	36
• Ensayo de depleción de eosinófilos	37
• Determinación del título de anticuerpos específicos por ELISA	37
• Estudio de la respuesta inmune celular	38
• Análisis de citoquinas y quimioquinas presentes en la cavidad Peritoneal	38
• Obtención de eosinófilos por clasificación celular	38
• Generación de eosinófilos derivados de la médula ósea	39
• Ensayo de degranulación de eosinófilos derivados de la médula ósea	39
• Inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ por parte de eosinófilos	39
• Análisis Estadístico	41

3. Resultados

• Los eosinófilos (células Siglec-F ⁺ F4/80 ^{int}) son reclutados en altas cantidades a la cavidad peritoneal y al hígado de animales infectados por <i>F. hepatica</i>	42
• El transcurso de la infección por <i>F. hepatica</i> se corresponde con un aumento en el daño hepático	45
• La concentración de CCL11, TSLP e IL-5 en ascitis de animales infectados aumenta con la gravedad de la infección	47
• El reclutamiento de eosinófilos en hígado y cavidad peritoneal aumenta con la gravedad de la infección	48
• Los eosinófilos de animales infectados expresan moléculas características de los granulocitos	50
• Los eosinófilos peritoneales de animales infectados poseen una mayor expresión de ROS y RNS en comparación con eosinófilos de animales no infectados	57
• Los eosinófilos derivados de la médula ósea (BM-Eos) degranulan al incubarse con anticuerpos específicos de <i>F. hepatica</i>	58
• Los animales infectados por <i>F. hepatica</i> presentan una respuesta T CD4 específica polarizada hacia Th2 y Treg	59
• Los eosinófilos provenientes de animales infectados inhiben la proliferación y producción de IFN- γ y de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de animales no infectados en condiciones <i>in vitro</i>	61
• Los eosinófilos limitan el daño hepático inducido durante la infección por <i>F. hepatica</i>	63
• La depleción de eosinófilos determina un aumento en la concentración de CCL11, TSLP e IL-5 en ascitis de animales infectados	66
• Los eosinófilos limitan el desarrollo de una respuesta T reguladora durante la infección por <i>F. hepatica</i>	67
• Los eosinófilos provenientes de animales infectados limitan la expansión de linfocitos T CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ específicos del parásito en condiciones <i>in vitro</i>	70
• La depleción de eosinófilos causa un aumento en la expresión génica de la	

citoquina reguladora TGF- β	71
• Los eosinófilos determinan el tipo de respuesta inmune humoral en animales infectados por <i>F. hepatica</i>	72
• Estudio de la capacidad de los anticuerpos presentes en animales infectados de mediar la degranulación de eosinófilos	73
4. Discusión	74
• Identificación de eosinófilos en la infección experimental murina por <i>F. hepatica</i>	74
• Mecanismos efectores mediados por eosinófilos durante la infección experimental por <i>F. hepatica</i>	76
• Inhibición de la proliferación de linfocitos T por parte de eosinófilos de animales infectados por <i>F. hepatica</i> en condiciones <i>in vitro</i>	77
• Rol de los eosinófilos durante la infección experimental por <i>F. hepatica</i>	78
5. Conclusiones	83
6. Bibliografía	84
7. Anexo	101

Índice de figuras y tablas

Tabla 1.1. Principales helmintiasis: prevalencia mundial y distribución	1
Figura 1.1. Distribución mundial de <i>F. hepatica</i> y <i>F. gigantica</i> , parásitos causantes de la fasciolosis	2
Figura 1.2. Estructura y morfología de un gusano adulto de <i>F. hepatica</i>	4
Figura 1.3. Ciclo de vida del parásito <i>F. hepatica</i>	5
Figura 1.4. Diferenciación de linfocitos T hacia diferentes subtipos efectores	9
Figura 1.5. Eosinófilos humanos vs. murinos	12
Figura 1.6. Ultraestructura del eosinófilo humano y murino	13
Figura 1.7. Desarrollo y diferenciación del eosinófilo	15
Figura 1.8. Mecanismos de secreción en eosinófilos	18
Tabla 1.2. Efecto de la depleción de eosinófilos en infecciones por parásitos helmintos en ratones PHIL o Δ dbiGATA	25
Figura 1.9. Hígado de cabra inmunizada con catepsina L1 y desafiada con <i>F. hepatica</i>	26
Tabla 2.1. Score clínico para ratones infectados por <i>F. hepatica</i>	31
Tabla 2.2. <i>Primers</i> específicos utilizados	34
Tabla 2.3. Anticuerpos específicos utilizados en citometría de flujo	35
Tabla 2.4. Anticuerpos específicos utilizados en inmunofluorescencia	37
Figura 3.1. Los eosinófilos son reclutados en alta proporción a la cavidad peritonea y al hígado en animales infectados por <i>F. hepatica</i>	44
Figura 3.2. Las células Siglec-F ⁺ F4/80 ^{int} de la cavidad peritoneal e hígado de animales infectados por <i>F. hepatica</i> poseen características morfológicas de eosinófilos	45
Figura 3.3. La gravedad de la infección por <i>F. hepatica</i> se corresponde con un aumento en el daño hepático	46
Figura 3.4. La infección por <i>F. hepatica</i> induce daño hepático y reclutamiento de eosinófilos hacia el hígado	47
Figura 3.5. Cuantificación de citoquinas TSLP e IL-5 y quimioquina CCL11 en ascitis y suero de animales infectados y no infectados	48
Figura 3.6. El reclutamiento de eosinófilos al hígado y cavidad peritoneal de animales infectados con <i>F. hepatica</i> aumenta con la gravedad de la infección	50
Figura 3.7. Estudio del fenotipo de eosinófilos peritoneales y hepáticos	51
Figura 3.8. Marcadores levemente o no expresados en eosinófilos	52
Figura 3.9. Expresión de marcadores en células de la cavidad peritoneal de animales infectados y no infectados	55
Figura 3.10. Expresión de marcadores en leucocitos hepáticos de animales infectados	56
Figura 3.11. Expresión de marcadores en eosinófilos sorteados de la cavidad peritoneal de animales infectados	57
Figura 3.12. Expresión de ROS/RNS en eosinófilos de PEC e hígado de animales infectados y no infectados	58
Figura 3.13. Degranulación de eosinófilos en presencia de FhTE y anticuerpos específicos anti- <i>F. hepatica</i> .	59
Figura 3.14. Caracterización de la respuesta T desarrollada durante la infección por <i>F. hepatica</i> en ratones	61
Figura 3.15. Inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ por parte de eosinófilos provenientes de animales infectados por <i>F. hepatica</i>	63
Figura 3.16. Depleción de eosinófilos en animales infectados por <i>F. hepatica</i>	65
Figura 3.17. La depleción de eosinófilos se asocia a un mayor daño hepático inducido por <i>F. hepatica</i>	66

Figura 3.18. Cuantificación de CCL11, TSLP e IL-5 en ascitis de animales tratados con anticuerpo α -Siglec-F, control isotipo y animales no infectados	67
Figura 3.19. Caracterización de la frecuencia de linfocitos T CD4 ⁺ en animales infectados depletados o no de eosinófilos	68
Figura 3.20. Producción de IL-10 e IFN- γ por linfocitos T CD4 ⁺ en animales infectados y tratados con anticuerpo α -Siglec-F o control isotipo, y en animales no infectados	69
Figura 3.21. Producción de citoquinas por esplenocitos estimulados con lisado parasitario (FhTE)	70
Figura 3.22. Los eosinófilos limitan la expansión de linfocitos T CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ específicos del parásito	71
Figura 3.23. Aumento en la expresión de TGF- β en el hígado de animales infectados y tratados con el anticuerpo α -Siglec-F	72
Figura 3.24. Los eosinófilos limitan la producción de anticuerpos específicos IgG e IgG1 durante la infección por <i>F. hepatica</i> .	73
Figura 3.25. Degranulación de eosinófilos en presencia de suero de animales infectados y tratados con anticuerpo α -Siglec-F o control isotipo	74
Figura 7.1. Estrategia de gating utilizada para definir eosinófilos en los ensayos de identificación de eosinófilos hacia la cavidad peritoneal, bazo e hígado en animales infectados por <i>F. hepatica</i> (Figura 3.1).	101
Figura 7.2. Estrategia de gating utilizada para definir eosinófilos en los ensayos de reclutamiento de eosinófilos hacia el hígado y cavidad peritoneal en animales infectados por <i>F. hepatica</i> (Figura 3.6).	102
Figura 7.3. Expresión de las moléculas Ly6G, Ly6C, CD80, Siglec-F y F4/80 en eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados por <i>F. hepatica</i> .	103
Figura 7.4. Expresión de las moléculas CD8, CD11c y CD11b en eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados por <i>F. hepatica</i> .	104
Figura 7.5. Expresión de las moléculas CD40, Sirp-alfa y MHCII en eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados por <i>F. hepatica</i> .	105
Figura 7.6. Expresión de las moléculas CD64, CD4 y CCR3 en eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados por <i>F. hepatica</i> .	106
Figura 7.7. Expresión de las moléculas CD162 y CD44 en eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados por <i>F. hepatica</i> .	107
Figura 7.8. Expresión de las moléculas Ly6G, Siglec-F, Ly6C, CD80 y F4/80 en eosinófilos del hígado de animales infectados por <i>F. hepatica</i> .	108
Figura 7.9. Expresión de las moléculas CD8, CD11c y CD11b en eosinófilos del hígado de animales infectados por <i>F. hepatica</i> .	109
Figura 7.10. Expresión de las moléculas CD40, Sirp-alfa y MHCII en eosinófilos del hígado de animales infectados por <i>F. hepatica</i> .	110
Figura 7.11. Expresión de las moléculas CD64, CD4 y CCR3 en eosinófilos del hígado de animales infectados por <i>F. hepatica</i> .	111
Figura 7.12. Expresión de las moléculas CD162 y CD44 en eosinófilos del hígado de animales infectados por <i>F. hepatica</i> .	112

1- Introducción

Fasciola hepatica y fasciolosis

Generalidades sobre los parásitos helmintos

Los helmintos son animales invertebrados que constituyen un amplio grupo no taxonómico de organismos (1). Pueden clasificarse en dos grandes grupos: nematodos o gusanos redondos y platelmintos o gusanos planos. Estos últimos pueden a su vez clasificarse en trematodos o cestodos (2). Los hospederos definitivos e intermediarios de los helmintos son muy diversos, y pueden ir desde mamíferos hasta aves, reptiles, moluscos o artrópodos (3). El sitio de infección puede variar en gran medida dependiendo del helminto. Por ejemplo, algunos nematodos de la especie *Filaria* se alojan y pueden obstruir los vasos linfáticos, mientras que otros como *Trichuris trichiura* residen en el epitelio. También pueden residir en el hígado o los ductos biliares como *Fasciola* (4).

Gran parte de la población mundial se encuentra infectada por alguna especie de parásito helminto, de hecho el 24 % de la población mundial (5). En particular, se estima que un tercio de las 3 mil millones de personas que viven en las regiones en desarrollo del África subsahariana, Asia y las Américas se encuentran infectadas con una o más especies de helminto (6). La mayoría de las infecciones se dan por nematodos como *Ascaris lumbricoides*, *T. trichiura* o *Necator americanus* (4) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Principales helmintiasis: prevalencia mundial y distribución. Extraído y modificado de (2).

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

Se ha observado que en comparación con cualquier grupo etario, los niños en edad pre-escolar, escolar y adolescentes presentan un mayor riesgo de infección por gusanos intestinales. Como consecuencia de dicha infección se ha registrado un retardo en el

crecimiento, así como también una disminución en la memoria y en la capacidad de razonamiento (2).

Además del gran impacto en la población humana, las infecciones por helmintos también afectan enormemente a animales de producción como el ganado bovino, ovino y caprino. Este hecho lleva a la pérdida de grandes sumas de dinero, influyendo directamente en la economía a nivel mundial (7). A pesar del demostrado impacto que poseen los parásitos helmintos tanto en la salud humana como animal, no se ha invertido lo necesario para la investigación y el desarrollo de tratamientos para las helmintiasis. Como dichas infecciones han sido relegadas, se las conoce actualmente como “enfermedades tropicales desatendidas” (2).

Fasciolosis

La fasciolosis es una enfermedad zoonótica causada por los gusanos trematodes del género *Fasciola*, como *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* (8). Dichas especies presentan una distribución diferencial. Mientras que *F. hepatica* puede ser encontrada en zonas templadas como Australia, Europa, las Américas y el este de África, *F. gigantica* reside en regiones tropicales (sudeste asiático, India y África medio este y sub-sahariana) (7) (Figura 1.1).

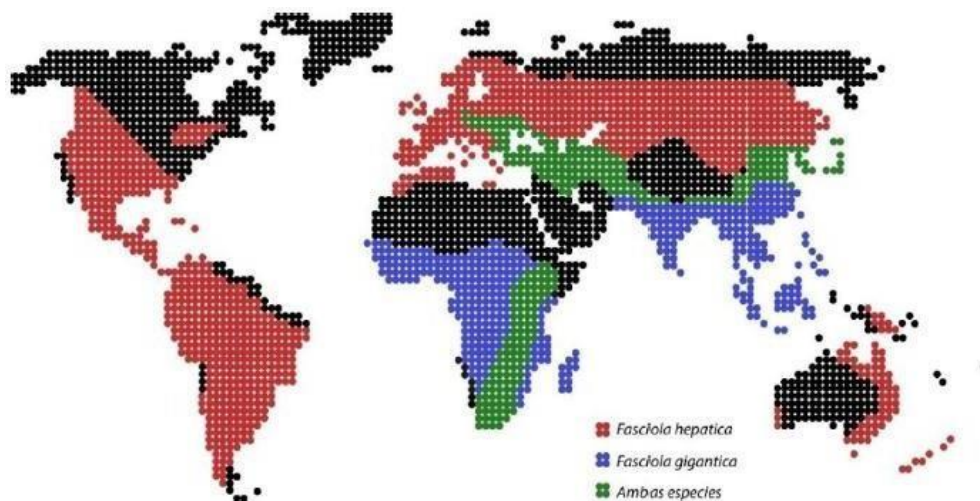


Figura 1.1. Distribución mundial de *F.hepatica* y *F. gigantica*, parásitos causantes de la fasciolosis. Extraído y modificado de (3).

La fasciolosis puede afectar a todos los animales mamíferos, pero se da en forma predominante en los rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos) y también en el ser humano. Las infecciones por *F. hepatica* y *F. gigantica* causan enormes pérdidas económicas a nivel mundial, específicamente de alrededor de 3 mil millones de dólares al año (9). Sin embargo, existe cierta dificultad a la hora de cuantificar las pérdidas de dinero, debido a que en ocasiones las infecciones no son reportadas, o los métodos diagnósticos no resultan confiables.

Las pérdidas económicas se ven reflejadas en una disminución en la producción de carne, leche y lana y en una reducción de la fertilidad. Esto incluye además el costo de las drogas utilizadas para combatir la fasciolosis y las infecciones secundarias que se originan por la infección con el parásito (7).

La fasciolosis en humanos ya fue declarada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida, estimándose que existen aproximadamente 17 millones de personas infectadas y 180 millones en riesgo de infección, mayormente en Sudamérica y África (10). En Sudamérica, la enfermedad se declaró endémica en Bolivia, Perú y Ecuador, con una alta prevalencia dentro de la población indígena Aymara (11). Sin embargo, la prevalencia de fasciolosis en humanos es subestimada, debido por un lado a la falta de seguimiento o encuestas epidemiológicas en áreas endémicas, y por otro a que alrededor del 50% de las infecciones por *Fasciola* son asintomáticas, resultando difíciles de diagnosticar (10).

Los mayores síntomas de la fasciolosis se correlacionan con el momento en el cual el gusano juvenil atraviesa la pared del intestino delgado, migra a través de la cavidad abdominal y finalmente invade el hígado y los ductos biliares. Importantes características clínicas de esta infección son lesiones hepáticas, fibrosis, inflamación crónica y obstrucción de los ductos biliares. Algunos de los síntomas más importantes de la fasciolosis son fiebre, dolor abdominal, urticaria, hepatomegalia, esplenomegalia y anemia, entre otros (12).

Fasciolosis en Uruguay

La fasciolosis en nuestro país posee una alta prevalencia en el ganado ovino y bovino y se focaliza preferentemente en áreas reducidas de establecimientos agropecuarios. En dichos establecimientos, la prevalencia de *F. hepatica* es siempre superior en bovinos, ya que los mismos tienden a pastorear en áreas más húmedas y bajas que el ovino (13). En cuanto a la prevalencia, estudios realizados por la Facultad de Veterinaria revelaron que de 40 establecimientos agropecuarios de la zona norte y este del país, un 62,5% tenía presencia de *F. hepatica* (14).

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

Más recientemente, se llevaron a cabo estudios serológicos en Salto donde el 67% de los bovinos testeados resultaron positivos para la infección por *F. hepatica*, con la prevalencia más alta en la raza Angus y los menores de 2 años (15).

Agente causal y Ciclo de Vida

F. hepatica es un parásito platelminto trematodo, perteneciente a la subclase *Digenea*. Posee una forma característica lanceolada aplanada, (Figura 1.2), además de dos ventosas, una bucal u oral y otra ventral.

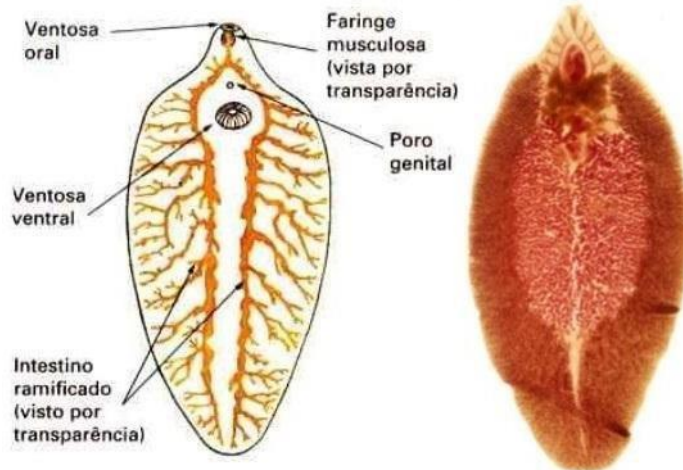


Figura 1.2. Estructura y morfología de un gusano adulto de *F. hepatica*. A la izquierda se muestra un esquema de la estructura de *F. hepatica* y a la derecha una fotografía del gusano adulto. Extraído y modificado de www.ecured.cu/Fasciola_hepatica.

El estado adulto del gusano presenta una forma plana sin segmentos de 2 a 3,5 cm de largo y de 1 a 1,5 cm de ancho. El tegumento del adulto es de gran importancia en este parásito ya que constituye la frontera con el medio ambiente. El mismo es plegado e invaginado y presenta espinas que le permiten aumentar la superficie de absorción e intercambio con el hospedero definitivo (16). El adulto posee además un intestino incompleto formado por la cavidad bucal, faringe y esófago. Este último se bifurca formando dos ramas laterales que continúan hacia la parte posterior del parásito y terminan en los ciegos intestinales. *F. hepatica* es un parásito hermafrodita con un útero corto y ovarios situados en posición anterior con respecto a los testículos.

En semejanza con otros parásitos helmintos, *F. hepatica* posee un ciclo de vida complejo y heteroxeno que necesita de un hospedero definitivo y otro intermediario (Figura 1.3). El hospedero definitivo lo constituyen los mamíferos herbívoros o el hombre, mientras que los intermediarios pueden ser algunas especies de caracoles de agua dulce, del género *Lymnaea* (18). En Uruguay, el principal caracol que actúa como hospedero intermediario es el denominado *Lymnaea viatrix*. Los caracoles que pertenecen a este género son anfibios que viven y se desarrollan en aguas poco profundas, como orillas de manantiales, tajamares y cañadas de corriente suave (15). El ganado bovino y ovino por lo general pastorea en estos ambientes, siendo este el motivo por el cual presentan niveles tan altos de infección por *F. hepatica*.

El gusano adulto se aloja en los ductos biliares del hospedero definitivo. Una vez allí, el parásito puede producir una gran cantidad de huevos (20.000 a 24.000 por gusano por día). Los mismos entran al duodeno con la bilis y son expulsados en las heces (17). Estos huevos, sin embargo, no se encuentran embrionados. Maduran luego de 9 a 15 días cuando se encuentran en un ambiente húmedo de entre 22° C a 25° C (15).

Cuando se reúnen las condiciones favorables de temperatura, humedad y presión de oxígeno, luego de 2 a 3 semanas se desarrolla un miracidio ciliado dentro del huevo. Dicho miracidio logra emerger del huevo por medio de enzimas que degradan y desprenden el opérculo del huevo. Una vez que logran eclosionar del mismo, nadan libremente mediante movimientos estimulados por la luz solar. Además, poseen un sistema de fototropismo y por eso cuentan con estructuras oculares. Este punto es crítico en el ciclo, ya que el miracidio cuenta con 24 horas para encontrar a su hospedero intermediario. De lo contrario, el ciclo no continúa (18).

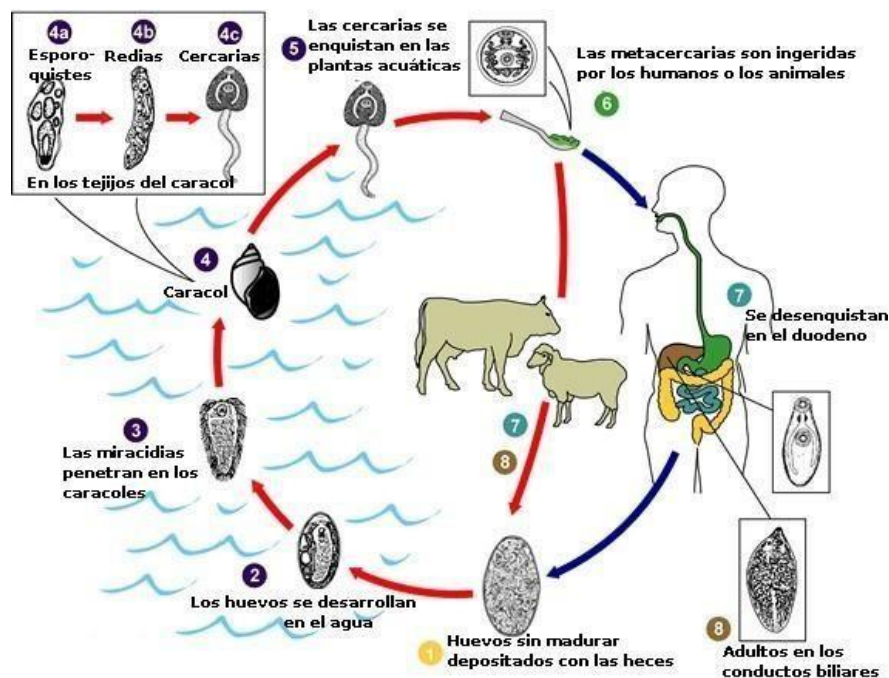


Figura 1.3. Ciclo de vida del parásito *F. hepatica*. El mismo requiere de dos tipos de hospederos, el intermediario (caracoles de agua dulce del género *Lymnaea*) y el definitivo (bovinos, ovinos o el hombre). Una vez que los huevos maduran eliminan una larva llamada miracidio que infectará al caracol.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

Si el miracidio encuentra a su hospedero intermediario perfora sus células epiteliales mediante enzimas degradativas e ingresa en el mismo. Posteriormente, el miracidio pierde su cubierta ciliada y forma un esporocisto, que consiste en una masa de células germinales. Cada una de estas células germinales es capaz de multiplicarse y formar una redia, que son liberadas en el

hígado del caracol. La redia también posee células germinales que se multiplican y producen el estadio larvario final, la cercaria (18). Todo este período lleva de 5 a 6 semanas (15).

Las cercarias tienen la particularidad de poseer una larga cola con la cual pueden nadar. De esta manera, la cercaria totalmente desarrollada deja el caracol y nada libremente en el agua por un periodo de pocos minutos a horas, fijándose en plantas acuáticas. Seguidamente a la fijación, la cercaria pierde la cola y se enquistada, formando una metacercaria (18).

El hospedero definitivo se infecta al ingerir una o más metacercarias. Cuando son ingeridas, la parte del quiste de la metacercaria es ingerida en el intestino delgado y los gusanos que emergen, llamados juveniles, penetran la pared del intestino delgado y se desplazan hacia la cavidad abdominal en alrededor de 2 horas. Luego atraviesan el espacio peritoneal y alcanzan el hígado dentro de 4 a 6 días. Los juveniles migran por el parénquima del hígado donde permanecen 5 semanas, causando hemorragia, inflamación y fibrosis. Finalmente, alcanzan los ductos biliares donde se vuelven sexualmente maduros y comienzan a depositar los huevos (18).

Control y tratamiento

La estrategia más importante que se utiliza actualmente para tratar la enfermedad consiste en emplear drogas anti-helmínticas fasciolicidas. De esta forma se disminuye también la contaminación de las pasturas con huevos (12). Aunque los fármacos utilizados son efectivos, no evitan el daño hepático y los animales no desarrollan inmunidad protectora, por lo que se infectan nuevamente (19). En la actualidad se utilizan varios anti-helmínticos, con diferentes espectros de acción y efectividad. Uno de los más empleados, sobre todo en Europa y Estados Unidos, es el Triclabendazole, ya que tiene un amplio espectro de acción (sirve tanto para juveniles como para adultos) y además presenta una alta efectividad (15). El problema con este tratamiento es que el parásito genera resistencia a la droga, tornando ineficaz el tratamiento (19).

Teniendo en cuenta esta situación, resulta de interés la producción de una vacuna que genere inmunidad protectora contra la infección. En primer lugar, porque evitaría la administración continua de anti-helmínticos, ahorrando tiempo y dinero. Además, los residuos químicos de los anti-helmínticos pueden aparecer en productos como la carne y la leche, generando también pérdidas económicas al provocar el rechazo de los consumidores (20).

Uno de los grandes problemas que existen al producir una vacuna contra la fasciolosis es que los parásitos helmintos establecen infecciones crónicas de larga duración y además generan una desregulación del sistema inmune del hospedero. Hasta el momento, se ha estudiado extracto de parásito, así como antígenos individuales como posibles candidatos vacunales, como la catepsina L o B y moléculas de unión a ácidos grasos (11). Sin embargo no existe ninguna vacuna comercial aprobada hasta el momento.

Sistema inmune

Características generales

El sistema inmune es un conjunto de células y moléculas efectoras encargadas de defender al organismo de diferentes agentes infecciosos, de la eliminación y renovación del tejido muerto o dañado, de la regulación de la respuesta inmune en diferentes situaciones, entre otras funciones (21). Su característica fundamental es su capacidad de diferenciar entre las células propias del organismo y estructuras o moléculas ajenas, y así desencadenar un proceso que se conoce como respuesta inmune. Esta respuesta es muy eficaz, ya que la mayoría de las veces no se desarrollan infecciones clínicamente evidentes, aun cuando existe una constante exposición a agentes patógenos (21).

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

- Barreras físicas y químicas, como los epitelios y péptidos antimicrobianos.
- Fagocitos (macrófagos, neutrófilos).
- Células linfoides innatas (ILCs, del inglés *innate lymphoid cells*) de tipo 1, 2 y 3.
- Granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos).
- Proteínas sanguíneas (sistema del complemento, proteínas de la cascada de la coagulación, entre otras).
- Un grupo de proteínas llamadas citoquinas.
- Células dendríticas (DCs, del inglés *dendritic cells*).

A diferencia de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa aumenta su capacidad defensiva con cada exposición al mismo microorganismo. Su nombre refiere al hecho de que aparece en reacción a una infección y se adapta a ella (22).

Los componentes principales de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y B. Dichas células reconocen los antígenos de los patógenos y responden específicamente a ellos. Los linfocitos B reconocen antígenos extracelulares y luego se diferencian a células plasmáticas, las cuales se especializan en la producción de anticuerpos. Los linfocitos T reconocen antígenos peptídicos lineales, presentados en una molécula del MHC (del inglés *molecular histocompatibility complex*) en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC, del inglés *antigen presenting cell*). Dependiendo de qué tipo de patógeno se trate, el linfocito T se diferenciará a un determinado subtipo efector, que va a producir cierto tipo de citoquina. Las citoquinas tienen variadas funciones muy importantes para el correcto control y eliminación del patógeno. Los linfocitos T se diferencian a cooperadores (CD4+) y citotóxicos (LTC, CD8+) (22).

Activación de linfocitos T cooperadores y diferenciación hacia subtipos efectoros

En una primera instancia, las DCs reconocen estructuras de patógenos que no están presentes en las células del huésped. Estas estructuras se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*). El reconocimiento de los PAMPs se da por receptores llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *pattern-recognition receptors*), que pueden encontrarse en la membrana plasmática de la DC, en su membrana endosomal o en el citosol. También pueden ser secretados. La familia de PRRs más estudiada en la DC son los receptores de tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-like receptor*) (22). Sin embargo, existen otro tipo de receptores que han cobrado gran interés en la investigación actual como los receptores lectina de tipo C (CLRs, *C-lectin receptors*), los de tipo NOD (NLR, *Nod-like receptor*) o los de tipo RIG (RLR, *Rig-like receptor*) que reconocen diferentes estructuras moleculares provenientes de patógenos (23, 24).

Una vez que el PAMP es reconocido, las DCs maduran, lo que consiste en su activación y migración desde el sitio donde reconocieron el PAMP hasta los órganos linfáticos secundarios, donde completan su maduración. La molécula microbiana reconocida sufre un proceso de proteólisis mediante el cual terminan generándose péptidos lineales de tamaño variable, que se unirán a moléculas del MHC de clase I y II, dependiendo de que la molécula patógena sea intracelular o extracelular, respectivamente. También pueden presentarse moléculas patógenas extracelulares en moléculas del MHC de clase I por un proceso conocido como presentación cruzada (25).

Todas las células nucleadas pueden expresar péptidos de patógenos unidos a moléculas del MHC de clase I, mientras que solo las APC pueden presentar péptidos unidos a moléculas del MHC de clase II. Esto significa que todas las células nucleadas del organismo pueden responder a una infección intracelular por un virus, por ejemplo (25).

En esta instancia, es importante aclarar que existen dos poblaciones de linfocitos T. Una de ellas posee la molécula CD4 en su membrana y la otra posee la molécula CD8. Las mismas actúan como co-receptores del MHC. Los linfocitos T CD8⁺ reconocen complejos péptido-MHC de clase I y se diferencian a LTCs, que son capaces de matar directamente a células infectadas por virus o células tumorales. Los linfocitos T CD4⁺ reconocen complejos péptido-MHC de clase II en la superficie de una APC y se diferencian a diferentes poblaciones efectoras, cada una con una determinada función (25).

El tipo de patógeno que invade el organismo va a activar diferentes tipos de receptores de la inmunidad innata, los cuales por diferentes vías de señalización determinarán que la célula produzca ciertas citoquinas, cuyo perfil decidirá qué tipo de respuesta inmune adaptativa se pondrá en marcha, con la consecuente producción de diferentes subtipos efectoros de linfocitos T cooperadores, que serán adecuados para combatir cierto tipo de infecciones (Figura 1.4) (26).

Existen diferentes tipos de linfocitos T cooperadores, basados en el tipo de citoquina que los mismos producen. Los primeros subtipos que fueron reportados son los subtipos Th1 y Th2. El primero produce esencialmente IFN- γ mientras que los Th2 producen varios tipos de citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Además de las citoquinas producidas, factores de

transcripción distinguen la diferenciación de cada subtipo, siendo T-bet el característico para las Th1 y GATA-3 el distintivo de las Th2 (27).

Los linfocitos Th1 son fundamentales para la defensa del huésped contra patógenos intracelulares, como virus, protozoarios o bacterias. Además de esto, poseen un rol central en la activación de macrófagos a través de la producción de IFN- γ (27). Las células Th2 resultan críticas para mediar las respuestas inmunes contra parásitos multicelulares, como los helmintos, a través de las citoquinas que ellas producen. Por ejemplo, La IL-4 promueve el cambio de isotipo de IgG1 a IgE y la IL-5 colabora con el reclutamiento de eosinófilos. Por su parte, la IL-13 estimula el movimiento del músculo liso intestinal. Todas estas acciones provocadas por las citoquinas colaboran para la adecuada eliminación del parásito. Los linfocitos Th2 también resultan importantes para la respuesta inmune patológica en el asma y las alergias (27).

El subtipo Th17 fue descubierto décadas después. Este subtipo de linfocitos resulta importante para combatir las infecciones de bacterias y hongos extracelulares, y produce varias citoquinas como IL-17, IL-21 e IL-22. Su factor de transcripción característico es ROR γ t.

Los linfocitos T reguladores se diferencian a través del factor de transcripción Foxp3. También se distinguen por la expresión del receptor de la citoquina IL-2, ya que necesitan de la misma para su supervivencia y la producen de forma autócrina. Pueden dividirse en dos grandes grupos; derivados del timo y derivados de la periferia. Producen fundamentalmente TGF- β e IL-10 y se encuentran implicados en el mantenimiento de la tolerancia así como en el control de las respuestas inmunes (27) (Figura 1.4).

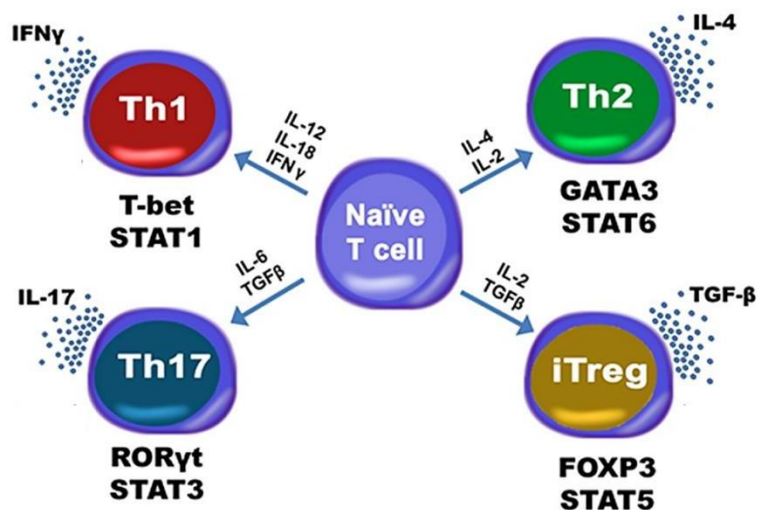


Figura 1.4. Diferenciación de linfocitos T hacia diferentes subtipos efectores. A partir de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes se generan diferentes subtipos de linfocitos T efectores, según el perfil de citoquinas producido por la DC. Extraído y modificado de (28).

Respuesta inmune frente a parásitos helmintos

Los parásitos helmintos co-evolucionaron con el sistema inmune de los vertebrados. Esto les permitió desarrollar estrategias para sobrevivir dentro del hospedero (29). De hecho, las infecciones por estos parásitos representan un gran desafío para el sistema inmune, principalmente debido a dos aspectos. El primero refiere al tamaño físico de estos parásitos, que hace imposible que puedan ser eliminados mediante un proceso de fagocitosis. Segundo, los helmintos tienen la capacidad de producir moléculas supresoras, o que le confieren a los leucocitos una función reguladora (30), favoreciendo la supervivencia del parásito.

Frente a una infección por parásitos helmintos la inmunidad innata representa la primera línea de defensa. En este sentido, los macrófagos, células vitales para el desarrollo de la respuesta inmune innata, poseen un rol importante para la eliminación de estos parásitos, sobre todo en las primeras etapas de su desarrollo. A través de sus receptores Fc pueden unirse a anticuerpos IgG o IgA en la superficie del parásito y así descargar su contenido lisosomal en un proceso conocido como citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (31). Se encuentra reportado que macrófagos de ratas son capaces de matar gusanos juveniles recién desenquistados (NEJs, del inglés *newly encysted juvenile*) de *F. hepatica*, mediante un proceso de ADCC donde participa el óxido nítrico producido por los macrófagos (32).

Los eosinófilos participan en la defensa frente a parásitos helmintos a través de la liberación del contenido de sus gránulos, los cuales poseen proteínas tóxicas para el parásito. Al igual que los macrófagos, el mecanismo principal por el cual liberan su contenido granular es ADCC. Además del papel clásico que los eosinófilos poseen en la eliminación de helmintos, en los últimos tiempos se le han adjudicado otras funciones como la producción de ciertas citoquinas y factores de crecimiento de células plasmáticas, promoviendo la producción de anticuerpos. Una gran variedad de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-13, TGF- β e IL-10 son producidas por los eosinófilos frente a una infección por helmintos, modulando la respuesta inmune tanto innata como adaptativa (33). Se profundizará más en las funciones de los eosinófilos y el papel de los mismos en infecciones helmínticas en secciones siguientes.

Los ILC2s poseen un papel destacado en el desarrollo de la respuesta inmune innata frente a parásitos helmintos, particularmente en la mucosa del intestino y los pulmones. Las mismas son activadas por IL-33 e IL-25, citoquinas que son producidas localmente en la mucosa luego de la infección. Las ILC2s producen IL-13 entre otras citoquinas, la cual induce la hiperplasia de células secretoras intestinales, incrementa la producción de mucus por las células caliciformes y recluta eosinófilos (34).

La respuesta inmune adaptativa desarrollada contra los parásitos helmintos resulta ser predominantemente del tipo Th2. Este tipo de respuesta resulta en la producción de algunas citoquinas como IL-5, IL-4 o IL-13. En el caso de algunos helmintos, como *F. hepatica*, la respuesta de tipo Th2 resulta ser en realidad una respuesta de tipo Th2 modificada, que se acompaña de la producción de IL-10 y TGF- β , además de la producción de IL-5, IL-4 e IL-13 (respuesta Th2/Treg). El desarrollo de esta respuesta modula y frena la inflamación, generando un ambiente donde los helmintos pueden desarrollarse mientras que al mismo tiempo se repara el daño al tejido producido por los mismos helmintos (35).

La IL-13, así como la IL-4, que se une tanto al receptor de la IL-4 como de la IL-13, inducen la activación del factor de transcripción STAT-6. La IL-4 lleva al cambio de isotipo de anticuerpos en los linfocitos B, resultando en la producción de inmunoglobulinas IgG específicas para el parásito e IgE. Los macrófagos y los eosinófilos expresan el receptor FcR γ , el cual al interactuar con las IgG que unen antígenos media la activación de estas células. Por otro lado, los basófilos, mastocitos y eosinófilos activados expresan el receptor Fc para IgE y son activados al unirse a este receptor por un lado, y por otro al reconocer antígenos parasitarios. Esta activación provoca la expulsión del contenido de los gránulos, los cuales poseen sustancias que son capaces de degradar la pared tisular del parásito (36).

La IL-4 y la IL-13 promueven además la activación alternativa de macrófagos, generando macrófagos de tipo M2. Los mismos son muy importantes en una infección por helmintos ya que secretan una gran cantidad de compuestos anti-helmínticos que disminuyen la sobrevivencia del parásito (37). También promueven la reparación tisular y el desarrollo de fibrosis.

La capacidad de inducir respuestas Th2/Treg por parte de los helmintos ha quedado evidenciada por diferentes estudios que demostraron que la infección por algunos de estos parásitos reduce los síntomas de muchas enfermedades autoinmunes y alergias en modelos animales (38). Una de las primeras evidencias experimentales fue reportada en ratas infectadas por el parásito *Symphacia obvelata*, el cual mejora los síntomas de la artritis inducida por el adyuvante de Freund (39). También se ha visto que la infección por *S. mansoni* disminuye los síntomas de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) (40). En el caso particular de *F. hepatica*, estudios recientes demostraron que la infección por este parásito también disminuye los síntomas de la EAE, mediante un mecanismo TGF- β dependiente (41). Otros estudios afirman que la IL-33 también posee un rol importante a la hora de disminuir los síntomas de las enfermedades autoinmunes (42).

En resumen, la infección por parásitos helmintos produce una respuesta de tipo Th2/Treg, lo que conlleva a un estado tolerogénico y a una inhibición del desarrollo de respuestas de tipo Th1 y Th17. Como consecuencia, las infecciones por este tipo de parásitos podrían disminuir los síntomas de alergias y enfermedades autoinmunes, pero al mismo tiempo aumentar la susceptibilidad a infecciones por patógenos intracelulares y otros patógenos que requieren respuestas inmunes del tipo Th1 para su eliminación.

Eosinófilos

Características generales

Los eosinófilos son un tipo de leucocito perteneciente a la categoría de los granulocitos, debido a la existencia de gránulos en su citoplasma. Fueron nombrados de esta manera por primera vez en 1879 por Paul Ehrlich, dado que sus gránulos se tiñen intensamente con el colorante ácido eosina (43), dándole un característico color fucsia.

La proporción de eosinófilos en sangre periférica resulta entre un 1 a un 3% del total de leucocitos, en condiciones basales o fisiológicas. Dicho porcentaje es similar en humano y ratón. Los eosinófilos humanos son ligeramente más grandes en tamaño que los murinos (12-15 μm contra 9-12 μm , respectivamente) y sus gránulos también son un poco mayores, empaquetados de manera más densa en el citoplasma (Figura 1.5). El núcleo del eosinófilo murino también presenta diferencias en comparación con el humano, siendo multi-lobulado en el caso de este último y con forma de anillo o esférico en el ratón (44).

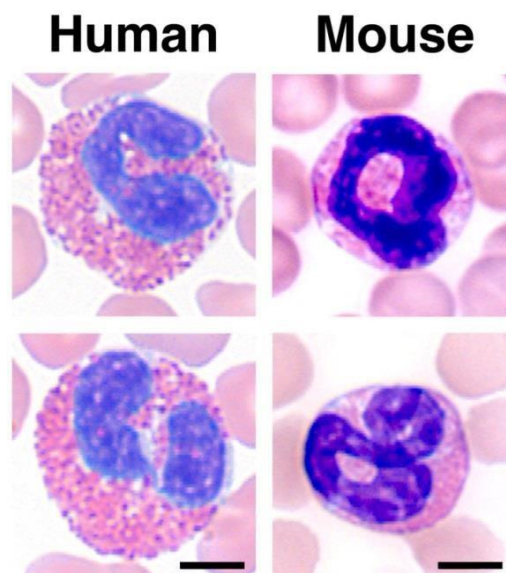


Figura 1.5. Eosinófilos humanos vs. murinos. Ciertas diferencias se observan entre los eosinófilos humanos y murinos, teñidos con tinción Romanowsky en la imagen, como tamaño, densidad de los gránulos o forma del núcleo. Extraído de (44).

Análisis ultraestructurales por microscopía electrónica contribuyeron con un estudio más específico de los gránulos de los eosinófilos, pudiendo diferenciar gránulos secundarios y primarios. También se identificaron cuerpos lipídicos y diversas poblaciones de pequeñas vesículas y túbulos elongados que residen tanto en los eosinófilos maduros como los activados (45,46) (Figura 1.6). En dichos cuerpos lipídicos se sintetizan leucotrienos, tromboxano y prostaglandinas. Las vesículas, por su parte, estarían cumpliendo un rol en la secreción (47).

Los gránulos primarios de los eosinófilos humanos (pero no murinos) contienen cristales de Charcot-Leyden (CLC), compuestos por galectina-10 (48). El rol de esta galectina no resulta del todo claro, si bien se ha visto que se expresa en los linfocitos Treg CD25⁺, donde sirve para promover la función supresora (49). Los gránulos secundarios están formados por un core electrón denso compuesto mayormente por la proteína básica mayor de tipo 1 (MBP-1, del inglés *Major Basic Protein*) y una matriz electrón translúcida compuesta por la proteína catiónica del eosinófilo (ECP, del inglés *Eosinophil Cationic Protein*), la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN, del inglés *Eosinophil Derived Neurotoxin*) y la peroxidasa del eosinófilo (EPO, del inglés *Eosinophil Peroxidase*) (44, 48). Además de proteínas catiónicas, diversos estudios realizados en la década de 1990 demostraron que en dichos gránulos específicos es posible encontrar gran variedad de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento (50). Algunas de estas citoquinas son TNF α , IL-4, IL-6, IL-13, IFN- γ , IL-10 e IL-12 en eosinófilos humanos (51). Se ha visto, además, que los eosinófilos humanos son capaces de generar citoquinas *de novo* a partir de la activación transcripcional, y regular la expresión de estas citoquinas a través de la regulación de la estabilidad del ARNm (52). En cuanto a los eosinófilos murinos, también se ha comprobado que son fuente de una gran diversidad de citoquinas, como IL-4, IL-6, IL-10, TNF α y APRIL (53). Si estas citoquinas ya se encuentran pre-formadas en los gránulos o si existe la posibilidad de que se generen *de novo*, es un aspecto que aún no se encuentra completamente caracterizado, como en el caso de los eosinófilos humanos (51).

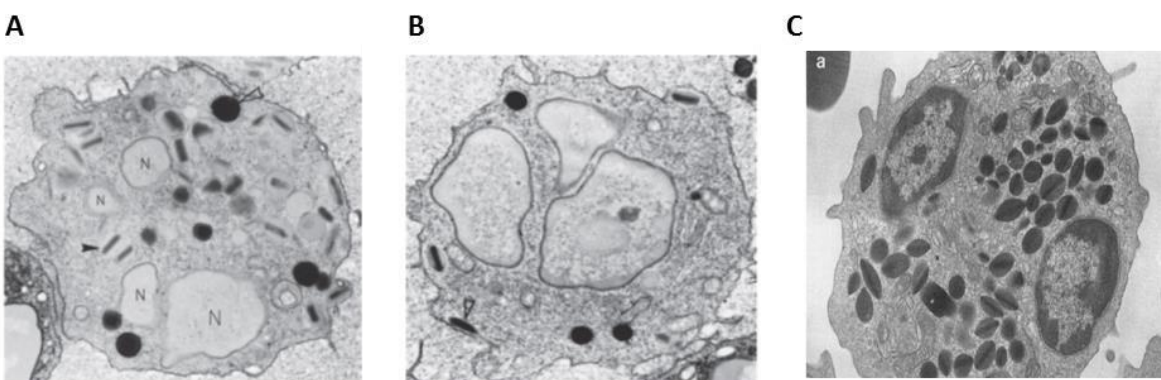


Figura 1.6. Ultraestructura del eosinófilo humano y murino. A) Eosinófilo humano maduro periférico. Se visualizan los gránulos específicos (flechas), múltiples lóbulos nucleares (N) y varios cuerpos lipídicos (flecha). **B)** Eosinófilo humano activado. Se observa un menor número de gránulos específicos, así como un mayor número de mitocondrias. La flecha muestra un gránulo específico que liberó todo su contenido de proteínas de la matriz, por lo que solamente queda el núcleo electrón denso. **C)** Eosinófilo murino. Se visualiza el núcleo bilobulado y gran cantidad de gránulos secundarios o específicos (flecha), compuestos por un core electrón denso rodeado de una matriz translúcida. Extraído y modificado de (45,46).

Las funciones de las proteínas tóxicas presentes en los gránulos secundarios son variadas. Tanto en humano como en ratón se identificaron dos genes ortólogos para MBP (MBP-1 y MBP-2), siendo la MBP-1 la más abundante en ambas especies (44). Esta proteína resulta tóxica para los parásitos helmintos, además de poseer propiedades anti-bacterianas, y regular la función de otras células del sistema inmune como mastocitos, neutrófilos y basófilos (54). Tanto ECP como EDN son ribonucleasas, ambas miembros de la superfamilia de la ribonucleasa A que poseen la habilidad de hidrolizar el ARN (55). Además de la toxicidad hacia helmintos, se ha registrado que la ECP es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos T y B *in vitro*, lo que indica que esta proteína podría regular la función de estas células *in vivo* (56). EDN posee

propiedades anti-virales, al ser capaz de degradar moléculas de ARN de cadena simple (57). Por otro lado, las proteínas ECP y EDN se han identificado en eosinófilos humanos y otros primates. Sin embargo, estudios recientes indican que en el ratón también existe una familia de genes que codifican para ribonucleasas, llamadas Ear (del inglés *Eosinophil-associated ribonuclease*). Todas las Ear identificadas también son proteínas catiónicas que retienen una fuerte actividad ribonucleasa (58). Por último, EPO, una haloperoxidasa que contiene un grupo hemo, se encuentra asociada con la eliminación de bacterias además de participar en vías de señalización (54). De todas las proteínas catiónicas granulares, parece ser que EPO es la más específica del linaje eosinofílico, ya que no se ha encontrado su presencia en otros leucocitos o células no hematopoyéticas (44).

Diferenciación de Eosinófilos

El ciclo de vida del eosinófilo transcurre en 3 sitios principales; la médula ósea, la sangre y ciertos tejidos, como el tracto gastrointestinal, el tejido adiposo, el timo o las glándulas mamarias (59). Los eosinófilos son generados en la médula ósea a partir de células madre pluripotentes (59), las cuales se diferencian a progenitores mieloides comunes (CMP, del inglés *common myeloid progenitors*). Dichos CMP luego se ramifican y algunos de ellos se comprometen hacia el linaje del eosinófilo. Estas células comprometidas, son llamadas EoPs (*eosinophil lineage committed progenitors*) y se caracterizan por expresar distintos marcadores en su superficie celular, como IL-5R α , CD34, ckit y Siglec-F en el ratón (60).

Tanto el humano como el ratón comparten los mismos factores de transcripción importantes para la diferenciación de los eosinófilos (Figura 1.7), de los cuales GATA-1 y C/EBP- α resultan ser los más críticos, ya que la delección de alguno de estos factores en el ratón resulta en una pérdida del linaje eosinofílico (61).

Dentro de las citoquinas más importantes para la diferenciación y el mantenimiento del linaje del eosinófilo se encuentran la IL-5, la IL-13 y el GM-CSF (44), siendo la IL-5 la más específica (62). Sin embargo, se ha demostrado que la IL-5 no es indispensable para la producción de eosinófilos en un estado basal, ya que se vio que el número de dichas células en sangre disminuye modestamente en ratones deficientes de IL-5 (63). Por el contrario, estos animales sí presentaron dificultades en aumentar el número de eosinófilos en sangre en el contexto de una respuesta inmune del tipo Th2 (63). Una vez que los eosinófilos maduran, pueden residir en la médula ósea o salir hacia la circulación y alojarse en diferentes tejidos o regiones. Bajo condiciones inflamatorias, pueden migrar hacia ciertos tejidos donde no residen en condiciones normales, o lo hacen en muy bajo número (64). En este contexto, la IL-5 puede resultar clave para el reclutamiento de eosinófilos hacia ciertos tejidos como el tracto gastrointestinal, el útero o el tejido adiposo, mientras que para otros, como los pulmones, resulta indiferente (62).

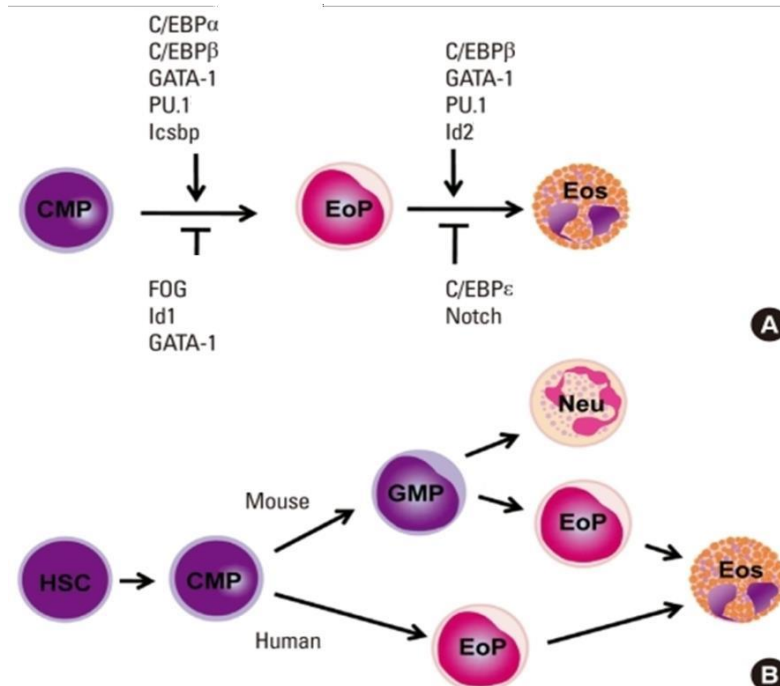


Figura 1.7. Desarrollo y diferenciación del eosinófilo. A) Factores de transcripción que participan en el compromiso y la diferenciación desde las CMP hacia el eosinófilo. **B)** Diferencias en las vías del desarrollo del eosinófilo en humano y ratón. Extraído y modificado de (65).

Moléculas Expresadas por Eosinófilos

Con respecto al reconocimiento de patógenos, estudios previos reportaron que los eosinófilos eran capaces de reconocer patógenos y fagocitarlos. Sin embargo, trabajos recientes indicaron que los eosinófilos no se encuentran directamente implicados en la fagocitosis. En vez de eso, se ha visto que eosinófilos del tracto gastrointestinal expulsan el ADN mitocondrial para confinar a los patógenos en la mucosa, denominándose *Eosinophil Extracellular Trap* (EET) (66).

Los eosinófilos tanto murinos como humanos expresan varios tipos de TLRs, que le permiten reconocer una gran variedad de PAMPs, incluyendo TLR1, 2, 3, 5, 6, 7 y 9 (67). La activación de estos TLRs lleva al desencadenamiento de cascadas de señalización que generan la producción de citoquinas por los eosinófilos. Este hecho puede explicar, por ejemplo, la exacerbación de las alergias durante una infección viral o bacteriana (68).

Particularmente, el TLR7 expresado por eosinófilos humanos reconoce ARN viral de simple cadena. En este sentido, se ha reportado variada actividad anti-viral por parte de los eosinófilos en varios sistemas. Por ejemplo, se encuentra reportado que la EDN posee un efecto inhibitorio en el virus del VIH (69), y que en una infección pulmonar viral, los eosinófilos cooperan con los macrófagos para prevenir el esparcimiento del virus hacia células vecinas, sugiriendo que los eosinófilos poseen un rol positivo al combatir infecciones virales a través de sus TLRs (70).

Los eosinófilos también expresan una gran variedad de receptores de citoquinas y quimioquinas, moléculas de adhesión y receptores para inmunoglobulinas y el sistema del complemento (71). Algunos receptores de citoquinas y quimioquinas que distinguen al eosinófilo de otras células del sistema inmune son la subunidad α del receptor de la IL-5 (IL-5 α) y el receptor de eotaxina-1 (CCL11), CCR3. La IL-5 es producida por los linfocitos Th2 activados y los mastocitos, además de por linfocitos NK (del inglés, *Natural Killer*) y por los mismos eosinófilos. Junto con la IL-4, IL-13 y las eotaxinas, promueve la activación y el reclutamiento de los eosinófilos hacia los distintos tejidos (48). En el ratón, CCR3 puede utilizarse como un marcador de los eosinófilos. Además, F4/80 también se expresa en eosinófilos murinos, pero en menor intensidad que en los macrófagos y células dendríticas. Otro marcador que es expresado en la superficie de los granulocitos murinos es el Ly6G, siendo los eosinófilos Ly6G^{low} y los neutrófilos Ly6G^{hi} (44). También se ha reportado que los eosinófilos intestinales, expresan la proteína reguladora Sirp- α (CD172 α) en altos niveles. Dicha proteína estaría contribuyendo a la homeostasis del eosinófilo al regular la degranulación en estas células, lo cual posee efectos notorios en su supervivencia. En particular, Sirp- α resultó de vital importancia para la supervivencia del eosinófilo al inhibir su degranulación (73). Además, Sirp- α podría estar inhibiendo la capacidad de remodelar tejidos que los eosinófilos poseen (73). Por otro lado, en eosinófilos humanos, los gránulos específicos de los eosinófilos poseen sus propios receptores de citoquinas y quimioquinas, lo que sugiere que podrían estar teniendo un rol inmunomodulador independiente (72). Además de expresar receptores y moléculas que participan en la inmunidad innata como los TLRs, los eosinófilos también pueden expresar moléculas que participan en la inmunidad adaptativa, como el complejo de MHC de clase II, y moléculas co-estimuladores tales como CD80, CD86, y CD40. Las mismas resultan clave para que el eosinófilo actúe como APC, estimule la proliferación de linfocitos T e inicie respuesta de tipo Th2 (74), como se ha visto en casos concretos.

Otro tipo de receptores que se expresan en la superficie de los eosinófilos son receptores de inducción de apoptosis, como el Siglec-8 en el humano o el Siglec-F en el ratón. Los mismos sirven para atenuar las respuestas inflamatorias al desencadenar el proceso de apoptosis (71). Por ejemplo, en eosinófilos humanos se ha visto que la unión de Siglec-8 a anticuerpos estimula la actividad de la caspasa 3, induciendo una apoptosis pronunciada de eosinófilos (71).

Reclutamiento de eosinófilos

Tanto en humano como en ratón, los eosinófilos constituyen alrededor de un 2% de los leucocitos sanguíneos y aproximadamente un 8% de leucocitos de la médula ósea. En condiciones basales, también se han encontrado eosinófilos en algunos tejidos, como el tracto gastrointestinal (del estómago al recto), el timo, los órganos linfáticos secundarios, el útero, las glándulas mamarias y el tejido adiposo (75).

Bajo condiciones de injuria o infección, son liberadas citoquinas proinflamatorias que estimulan a las células cercanas a expresar moléculas de adhesión endotelial y factores quimiotácticos, permitiendo que leucocitos sanguíneos sean atraídos hacia dicha zona y puedan extravasar desde el torrente sanguíneo a los tejidos, cumpliendo diversas funciones. Al

igual que muchos leucocitos, los eosinófilos también pueden ser atraídos hacia los sitios de inflamación. De hecho, la infiltración de eosinófilos es un patrón común en las enfermedades inflamatorias alérgicas, como el asma (76) o la esofagitis eosinofílica (77). El reclutamiento de eosinófilos desde la circulación hacia los tejidos comprende un contacto inicial o rodamiento seguido de una adhesión más firme al epitelio y una transmigración hacia los sitios de inflamación, guiada por las quimioquinas (76). El rodamiento inicial sobre el endotelio y la posterior adhesión firme se encuentran mediados por P-selectina en el endotelio y PSGL-1 en la superficie del eosinófilo, además de otras moléculas como VCAM-1 y las integrinas $\alpha 4$ (76). La migración a través del endotelio se encuentra mediada por la acción de quimioquinas pro-inflamatorias, predominantemente por eotaxinas, como CCL11 y CCL24 en el ratón (78), que se unen a CCR3 presente en la superficie del eosinófilo. La importancia de las eotaxinas en la migración de los eosinófilos se ha comprobado al utilizar ratones *knock out* para la eotaxina 1, donde no se observó infiltración de eosinófilos en pulmones de ratones infectados con el virus respiratorio sincicial (79).

En los últimos tiempos, se ha visto que estructuras complejas de carbohidratos expresados en la superficie celular como heparan-sulfato o N-glicanos podrían estar jugando un rol importante en la migración y el reclutamiento de eosinófilos. Dichas estructuras de carbohidratos se unen a su ligando, las galectinas (especialmente las galectinas 1 y 3), presentes en el endotelio o en los eosinófilos (80). Se encuentra reportado que la galectina 3 (Gal-3) posee un rol pro-inflamatorio en varios modelos agudos de inflamación como asma o dermatitis atópica, y que la exposición a alérgenos resulta en un aumento en la producción de eosinófilos que expresan Gal-3 (81). Además, la expresión de Gal-3, tanto en eosinófilos como en el endotelio, resulta fundamental para la correcta adhesión y migración de estos granulocitos, ya que los eosinófilos deficientes en Gal-3 mostraron una disminución en la migración hacia un gradiente de eotaxina-1, a pesar de poseer niveles normales de CCR3 (82).

Una vez que se encuentran presentes en el sitio de infección, uno de los mecanismos efectores más importantes del eosinófilo es la degranulación. Específicamente, luego de que los eosinófilos son activados, son capaces de liberar el contenido preformado de sus gránulos primarios frente a un estímulo rápido y específico. Dicho contenido puede ser liberado a través de tres mecanismos principales: i) Exocitosis clásica ii) Citólisis con liberación de gránulos, iii) Degranulación Fragmentada (PMD, del inglés *Piecemeal Degranulation*). En cuanto a la exocitosis, estudios *in vitro* han mostrado que los eosinófilos pueden degranularse en la superficie de parásitos helmintos (83). Sin embargo, la liberación del contenido completo de los gránulos por medio de la exocitosis fue rara vez visto *in vivo*, como si es el caso de basófilos o mastocitos, donde la unión de IgE a su receptor Fc ϵ R1 desencadena la exocitosis. También se ha visto que eosinófilos humanos pueden realizar citólisis *in vivo* (82). Dicho proceso se caracteriza por decondensación de la cromatina, formación de redes de ADN que salen del núcleo y expulsión de gránulos que aún conservan su membrana (85). Se ha evidenciado la presencia de gránulos extracelulares de eosinófilos rodeados de membrana en varias patologías humanas como el asma (86) o la rinitis alérgica (87), mientras que en el ratón se han detectado en el tracto gastrointestinal (88). Estos gránulos extracelulares podrían poseer un rol funcional, ya que aún retienen la capacidad de unirse a ligandos y de secretar sus citoquinas preformadas (89). En el último mecanismo de degranulación mencionado, PMD, vesículas secretorias transportan proteínas contenidas dentro de los gránulos hasta la membrana plasmática para su secreción (90) (Figura 1.8).

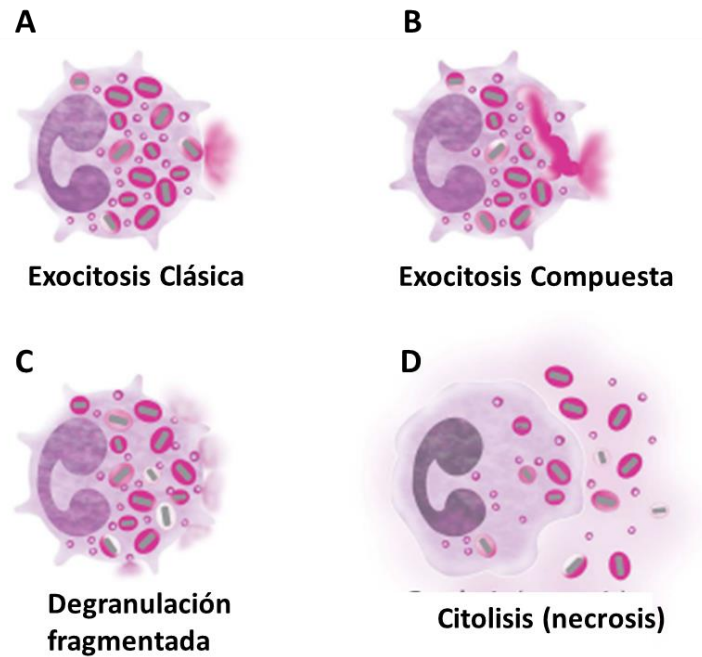


Figura 1.8. Mecanismos de secreción en eosinófilos. **A)** Exocitosis Clásica: gránulos individuales se fusionan con la membrana plasmática liberando su contenido. **B)** Exocitosis Compuesta: gránulos intracelulares se fusionan entre sí y luego con la membrana plasmática para liberar el contenido. **C)** Degranulación fragmentada (PMD): transporte por medio de vesículas del contenido de los gránulos secretores a la superficie celular. **D)** Citólisis: liberación de gránulos intactos al espacio extracelular luego de la lisis de la célula. Extraído y modificado de (90).

Al mismo tiempo, los gránulos intracelulares permanecen intactos y van liberando las proteínas de esta forma. En eosinófilos humanos, se ha visto que diferentes estímulos desencadenan la liberación de un patrón diferente de citoquinas a partir de los gránulos, basados en el tipo de respuesta Th1, Th2 o reguladora. Existen estudios *in vivo* que sugieren que este mecanismo también podría darse en eosinófilos murinos, en un mecanismo inducido por agonistas activadores (91).

Activación de los eosinófilos

Los eosinófilos pueden activarse mediante el reconocimiento de diferentes tipos de moléculas, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. En relación a la inmunidad innata, se encuentra reportado que los eosinófilos humanos expresan TLR1, TLR4, TLR7, y TLR10 (92), y que el ligando de TLR7, R-848, es capaz de activar tanto a los eosinófilos humanos como murinos, demostrando la importancia de los mismos durante una infección viral (93). Los eosinófilos también pueden activarse por la unión de moléculas del complemento como C3a, C5a, C3b, C4b y C1q, a través de la expresión de receptores como C3aR, C5aR, CR1, CR2, CR3, entre otros (92). La activación de los eosinófilos también puede ser inducida por otras moléculas biológicas. Por ejemplo, debido a una injuria al tejido, se liberan moléculas endógenas indicadoras de estrés y tejidos dañados, como el ácido úrico o el ATP (94). Se ha observado que los eosinófilos humanos son atraídos por los cristales de ácido úrico y producen una gran cantidad de citoquinas y quimioquinas (95).

Las moléculas de la inmunidad adaptativa también pueden activar a los eosinófilos, como ser anticuerpos a través de su unión a los receptores Fc. En este sentido, se vio que esferas de sefarosa sensibilizadas con IgG, IgA e IgA secretora estimulan la degranulación de los

eosinófilos (96), siendo la IgA secretora la más efectiva. La IgG también estaría participando en la activación de los eosinófilos. De hecho, en ratones se detectó la presencia de tres receptores Fcγ; FcγRI, FcγRII y FcγRIII (97). En cuanto a la IgE, su rol en la activación de los eosinófilos resulta controversial. Mientras que los eosinófilos humanos activados son capaces de expresar hasta tres tipos de receptores de IgE (98), no se ha detectado hasta el momento la presencia de receptores de IgE en eosinófilos murinos (97).

Por otro lado, se ha observado que los eosinófilos activados cambian su morfología. De hecho, los eosinófilos purificados a partir de sangre periférica y tratados con IL-5 presentan una protrusión de la membrana celular sin gránulos, llamada nucleopodo (99). La activación de los eosinófilos también provoca cambios en la expresión de ciertas moléculas. Se ha visto que luego de cultivar eosinófilos con GM-CSF, IL-5 e IL-3 los mismos expresan HLA-DR e ICAM-1, teniendo la capacidad de procesar y presentar antígenos a linfocitos T CD4⁺ en determinados contextos (100). Estas citoquinas también producen un aumento en la expresión del marcador de activación CD69 y de la β2 integrina CD11b (101). Por otro lado, los eosinófilos obtenidos de sangre periférica de pacientes con infecciones helmínticas mostraron un aumento en la expresión de ciertos marcadores como ICAM-1, HLA-DR, CD11b, CD11c, y CD44, entre otros. Luego de ser activados, los eosinófilos mueren por apoptosis y son fagocitados por otras células como los macrófagos. Sobreviven entre 4 y 5 días en los sitios de infección, por lo que poseen un tiempo de recambio rápido (97).

Algo importante a tener en cuenta es que el perfil de activación, que incluye las moléculas que expresará en su membrana así como las citoquinas que almacenará en sus gránulos, depende del ambiente inmunológico donde el eosinófilo es activado, pudiendo variar según la situación.

Funciones efectoras clásicas de los eosinófilos

Los eosinófilos poseen un papel primordial en el desarrollo del proceso inflamatorio provocado por alérgenos y en las infecciones por parásitos helmintos. De hecho, la infiltración de eosinófilos es una característica común a muchas patologías inflamatorias alérgicas, como asma, rinosinusitis, esofagitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica y dermatitis atópica (71). Por otro lado, los eosinófilos son reclutados a los sitios de inflamación en infecciones por helmintos y eliminan al parásito a través de la liberación del contenido de sus gránulos (33). Más recientemente, se ha determinado que los eosinófilos están implicados en patologías no inflamatorias, como la enfermedad de Crohn y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (102).

Los eosinófilos participan en la inflamación inducida por alérgenos a través de la liberación de las proteínas catiónicas citotóxicas, citoquinas, quimioquinas y mediadores lipídicos contenidos en sus gránulos que poseen potentes efectos inflamatorios y destructivos en el tejido. Por ejemplo, las proteínas catiónicas y las especies reactivas del oxígeno (ROS) dañan directamente a las células epiteliales, mientras que los mediadores lipídicos promueven la contracción del músculo de las vías aéreas, la producción de mucus y la permeabilidad vascular (103). Además, a través de su proteína catiónica MBP, los eosinófilos pueden estimular la liberación de histamina por los mastocitos (104).

El rol inmunológico de los eosinófilos contra las infecciones por parásitos helmintos fue postulado en 1939. La eliminación de parásitos de gran tamaño se da en presencia de

anticuerpos y/o del sistema del complemento, que al unirse a su receptor en la superficie de los eosinófilos desencadenan el proceso de degranulación con la consecuente liberación de proteínas, citoquinas y especies reactivas del oxígeno tóxicas para el parásito. Además de unirse a inmunoglobulinas y proteínas del complemento, los eosinófilos pueden reconocer carbohidratos en la superficie del parásito, como moléculas de adhesión celular y Lewis^x, como se ha demostrado en *Schistosomula* para eosinófilos humanos (97). Se profundizará más sobre las funciones de los eosinófilos sobre los helmintos en secciones siguientes.

Otra función efectora de los eosinófilos es la de generar la remodelación del tejido. Ciertos DAMPs (del inglés, *damage-associated molecular patterns*) que son liberados en el tejido necrótico son reconocidos por los PRRs de los eosinófilos presentes en ese tejido, promoviendo su activación y supervivencia (105). Se ha inferido que esta activación podría ser beneficiosa para la reparación del tejido dañado, por ejemplo para mantener las barreras de los tractos gastrointestinal y respiratorio. El efecto secundario generado por la remodelación del tejido por parte de los eosinófilos es el efecto fibrogénico, pudiendo evidenciarse el mismo en algunas patologías alérgicas inflamatorias, donde al inicio domina una fase inflamatoria aguda mientras que un proceso de fibrosis predomina en la etapa crónica. Durante esta etapa crónica, un gran número de mediadores del eosinófilo como el TGF- β , citoquinas de tipo Th2 y proteínas de los gránulos como MBP y EDN poseen un rol muy importante en promover la hiperplasia del epitelio, la reorganización de la matriz y la fibrosis (105).

Recientemente, se ha reportado otro mecanismo efector de los eosinófilos, que consiste en la liberación de ADN y proteínas granulares, conocida como eetososis, proceso que induce la formación de trampas extracelulares conocidas como EETs. A diferencia de las NETs (*Neutrophil extracellular traps*), en las EETs los gránulos son liberados intactos, conservando en su interior las proteínas granulares, en contacto con el ADN que también fue liberado. Dichas EETs participan principalmente en controlar las infecciones por agentes patógenos, como parásitos, virus, bacterias u hongos, pero también se ha visto que podrían participar en el daño asociado a ciertas patologías como sepsis, diabetes y autoinmunidad (102).

Funciones moduladoras de los eosinófilos

Los eosinófilos son capaces además, en determinados contextos, de presentar antígenos, estimular los linfocitos T, y promover las respuestas humorales al interactuar con los linfocitos B. También, pueden modular la función de las DCs. En el trabajo publicado por Chu et al., se observó que los eosinófilos controlan la activación de las DCs CD103⁺ en el intestino delgado a través de la enzima peroxidasa, promoviendo su activación y movilización hacia los ganglios linfáticos (106).

Otros estudios indican que los eosinófilos pueden poseer un papel importante en la homeostasis de células plasmáticas en la médula ósea (107). De hecho, pueden promover la supervivencia de los linfocitos B, la proliferación y la secreción de anticuerpos (107). Los eosinófilos que migran hacia el tracto gastrointestinal también se han visto implicados en la producción de IgA por las células plasmáticas presentes en las placas de Peyer, ya que animales depletados de eosinófilos poseen un menor número de linfocitos B productores de IgA en la lámina propia, siendo los niveles de IgA restaurados al realizar una transferencia adoptiva de eosinófilos provenientes de ratones salvajes (108). Los eosinófilos activados pueden expresar MHC de clase II en su membrana, y pueden actuar como APCs durante la infección por *Strongyloides stercoralis* (109). En este modelo, se vio que los eosinófilos participan en la inducción de producción de IgM e IgG específicas, demostrando un posible rol regulador sobre los linfocitos B (109).

En cuanto a los linfocitos T, los eosinófilos pueden regular su función al expresar citoquinas del tipo Th1 y Th2. Se ha observado que en presencia de eosinófilos, los linfocitos Th2 se activan produciendo citoquinas tales como IL-4 e IL-5 (110). Sin embargo, los eosinófilos también pueden ser capaces de suprimir la respuesta de los linfocitos T, por ejemplo, inhibiendo la activación y la expansión de linfocitos T pre-malignos humanos (111), la diferenciación de linfocitos Th17 en el intestino delgado en condiciones de homeostasis, o la de linfocitos Th2 en las placas de Peyer, en una infección murina intestinal por nematodos (112, 113).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado la existencia de eosinófilos reguladores o supresores. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Goldmann et al., un nuevo subgrupo de células supresoras mieloides granulocíticas (MDSCs, del inglés *myeloid derived suppressor cells*), con características fenotípicas de los eosinófilos, fue identificado. Estos Eos-MDSC ejercen un potente efecto inhibitorio sobre los linfocitos T en el contexto de una infección bacteriana en ratón (114). En el contexto humano, los eosinófilos inmunoreguladores pueden suprimir las respuestas de los linfocitos T a través de la galectina-10 (77). Otro reporte indica que, en el contexto de una infección bacteriana, los eosinófilos estarían controlando la respuesta de tipo Th1 desarrollada a través de un aumento en la expresión de la molécula PD-L1, ya que la depleción de eosinófilos resultó en un mejor control de la infección, un aumento de la inflamación y una respuesta Th1 más pronunciada (115).

Por lo tanto, el papel de los eosinófilos en el desarrollo de respuestas inmunes adaptativas puede ser dual, pudiendo estimular estas respuestas a través de sus citoquinas o al actuar como APC, y ejerciendo también efectos supresores y reguladores, impidiendo la proliferación y activación de linfocitos T.

La presencia de eosinófilos cumple un rol fundamental en mantener la homeostasis en ciertos tejidos. Por ejemplo, se ha visto que co-cultivos *ex vivo* de eosinófilos con células plasmáticas promueve la supervivencia de estas últimas (116), por lo que los eosinófilos son vitales para la

supervivencia a largo plazo de las células plasmáticas en la médula ósea.

Asimismo, los eosinófilos podrían estar influenciando la microbiota intestinal, dado que la deficiencia de eosinófilos se ha visto asociada con alteraciones en la composición de dicha microbiota (117). Por último, estudios recientes han indicado que eosinófilos intestinales pueden inducir la diferenciación de linfocitos T *naive* en linfocitos T reguladores, a partir de mecanismos dependientes de IL-1 β y ácido retinoico (118).

En otros estudios se ha propuesto que los eosinófilos contribuyen al proceso de tolerancia central y selección negativa de linfocitos T en el timo, ya que se observó la presencia de los mismos en la vecindad de timocitos doble negativos en el timo (119). Otros reportes proponen que los eosinófilos podrían contribuir con la eliminación de células apoptóticas en el timo, dado que ratones deficientes en eosinófilos a los cuales se les aplicó radiación que inducía la muerte de timocitos, vieron disminuida su habilidad para eliminar las células en proceso de apoptosis (120).

En las glándulas mamarias los eosinófilos regulan la elongación y la ramificación de los ductos glandulares, con la posible implicancia de TGF- β (121, 122). Además, se reclutan eosinófilos en las glándulas mamarias durante el embarazo, ya que son necesarios para un mayor desarrollo de las mismas (121). Por otro lado, el reclutamiento de eosinófilos al útero normal ha sido descrito en ratón. Dichas células son las más prevalentes en el útero durante el ciclo murino, y estudios en ratón y humano indicaron que los eosinófilos se acumulan y degranulan en el útero en asociación con los procesos degradativos que preparan al cérvix para el parto, y durante la fase de regeneración del tejido en la etapa de post-parto (123, 124).

En el tejido adiposo, los eosinófilos se encuentran presentes junto con macrófagos alternativamente activados (AAMs, del inglés *alternative activated macrophages*). Dichos eosinófilos producen IL-4, favoreciendo la polarización de los macrófagos hacia este fenotipo alternativo (125). Los AAMs poseen un rol crucial en la regulación del metabolismo de la glucosa protegiendo contra la obesidad (126). Por lo tanto, en ausencia de eosinófilos, los AAMs se ven disminuidos y el metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo se ve afectado (127). Este eje eosinófilo/macrófago se encuentra regulado por los ILC2 (128). En su conjunto, estos datos indican que, además de poseer funciones efectoras importantes en enfermedades alérgicas inflamatorias e infecciones por parásitos helmintos, los eosinófilos residen en varios tejidos con el fin de mantener la homeostasis.

Papel de los eosinófilos en infecciones por parásitos helmintos

Como se mencionó anteriormente, las infecciones por parásitos helmintos inducen respuestas inmunes caracterizadas por producción de anticuerpos IgE, eosinofilia en sangre y tejidos, y respuesta de mastocitos (129). Se encuentra ampliamente reportado que los eosinófilos poseen un rol efector fundamental en el control de las infecciones causadas por parásitos helmintos, el cual es generado por la fuerte respuesta de tipo Th2 (y más recientemente, también la Th9) desarrollada frente a este tipo de parásitos. Este hecho es apoyado por estudios donde se demostró claramente la capacidad de los eosinófilos de matar larvas de helmintos *in vitro* (130) e *in vivo* (131) mediante el mecanismo de ADCC. En dicho proceso, las células inmunes efectoras eliminan células diana o parásitos recubiertos de anticuerpos. Los eosinófilos, por lo tanto, utilizan el mecanismo de ADCC para eliminar directamente una gran cantidad de especies de larvas de helmintos a través de la acción de las proteínas catiónicas liberadas. Sin embargo, los eosinófilos no resultan tan relevantes a la hora de eliminar los estadios adultos de la mayoría de helmintos (132).

Además de colaborar con la eliminación de los parásitos helmintos a través de la liberación del contenido granular, diversos trabajos han reportado la capacidad de los eosinófilos para actuar como APC y activar linfocitos T productores de IL-5, colaborando con la respuesta de tipo Th2 generada durante la infección por helmintos. En efecto, los eosinófilos murinos expuestos a antígenos de *S. stercoralis* poseen una expresión elevada de MHC de clase II y CD86, llevando a linfocitos T CD4⁺ naive o efectores a producir IL-5 (133).

Como se mencionó anteriormente, durante las infecciones helmínticas se genera un alto nivel de IgE, el cual es capaz de reconocer antígenos del parásito. Se ha visto que eosinófilos humanos expresan el receptor específico para IgE, pudiendo unirse a este anticuerpo en la superficie del parásito y desencadenar el proceso de ADCC. De esta manera, son liberadas las proteínas tóxicas de sus gránulos como MBP, EDN o EPO (105) que dañan y en última instancia son capaces de matar al parásito. En eosinófilos murinos, sin embargo, se evidenció una ausencia del receptor de IgE de baja afinidad, FcεRII, y no se detectó IgE unida a dichos eosinófilos. Sin embargo, sí se detectó la presencia de receptores Fc para IgG, por lo que los eosinófilos murinos podrían realizar ADCC por medio de este isotipo de anticuerpo (134). En los últimos tiempos, también se le ha adjudicado un rol a los linfocitos T en la degranulación. En particular, se observó que ratones carentes de linfocitos T y B infectados con *Nippostrongylus brasiliensis* presentan eosinófilos incapaces de degranular en los pulmones (135). Los parásitos helmintos han desarrollado mecanismos para prevenir esta forma de ataque del sistema inmune. Por ejemplo, *F. hepatica* es capaz de clivar anticuerpos IgG e IgE específicos que podrían realizar ADCC (136), a través de la liberación de la proteasa catépsina L.

Además de ADCC, existe un mecanismo alternativo para el control de las infecciones por helmintos, en el cual los anticuerpos impiden el movimiento de la larva en el tejido, permitiendo así que los eosinófilos puedan unirse. Trabajos recientes reportaron que los anticuerpos específicos de *N. brasiliensis* pueden cooperar con los basófilos para impedir la movilización de larvas (137). Otro mecanismo adicional consiste en la EETosis, es decir la inmovilización de las larvas debido a la liberación de fibras de ADN y proteínas granulares por parte de los eosinófilos (138), como ya se mencionó.

En la sección anterior se mencionó la importancia de los eosinófilos para el mantenimiento de células plasmáticas en la médula ósea y para regular la proliferación de los linfocitos B. Esta función también posee un impacto en los mecanismos efectores contra parásitos helmintos, ya que mantiene la producción de anticuerpos, los cuales son importantes para poder ejercer mecanismos efectores anti-helmínticos. En particular, se observó que los eosinófilos son requeridos para la producción de anticuerpos específicos IgG2c contra *T. spiralis* (139), si bien no resultaron indispensables para la producción de IgM específica durante una infección primaria por *S. stercoralis* (140).

La función de los eosinófilos en combatir infecciones por parásitos helmintos ha podido ser investigada gracias al desarrollo de estrategias de depleción de eosinófilos y modelos de ratones transgénicos carentes de eosinófilos. Un ejemplo de estos últimos son los ratones Δ dblGATA, los cuales poseen una delección en el promotor del gen del factor de transcripción GATA-1, bloqueando el desarrollo del linaje de los eosinófilos (140). Otro modelo son los ratones PHIL, a los cuales se les insertó el gen del receptor de la toxina diftérica bajo el control del promotor del gen de la EPO, por lo que genera apoptosis de eosinófilos luego de la administración de la toxina diftérica (141). Algunos datos de estudios realizados en estos animales indican que los eosinófilos no son indispensables para combatir a los helmintos, mientras que otros indican que sí lo serían, protegiendo al huésped. Por último, se han reportado casos donde los eosinófilos pueden incluso proteger al parásito (33).

En cuanto a la protección del huésped, en un estudio realizado por Knott et al., utilizando un modelo de infección subcutánea por *N. brasiliensis*, se vio que aumentaba la migración de las larvas hacia los pulmones en ratones *knock out* para IL-5 o Δ dblGATA, además de aumentar la cantidad de huevos durante la fase intestinal del parásito (140). De igual forma, la migración de larvas de *T. spiralis* se vio aumentada en ratones Δ dblGATA, así como su deposición en el músculo (137), proceso que estaría inhibido o limitado por eosinófilos a través de ADCC. Por otro lado, también se observó que los eosinófilos contribuyen a la supervivencia de las larvas en la infección por *T. spiralis*, por lo que su rol en esta infección resulta controversial (137). La infección experimental murina por el nematodo *Heligmosomoides polygyrus* constituye otro ejemplo donde los eosinófilos estarían siendo beneficiosos para el parásito, ya que se vio que en ratones Δ dblGATA las hembras poseen menor fecundidad (113).

Otro caso donde los eosinófilos resultan de importancia a la hora de proteger al huésped de la infección es *Brugia*, que causa una infección llamada filariasis linfática. En dicha infección, los parásitos infectan los vasos linfáticos y los ganglios linfáticos, causando linfoedema (142). En un modelo de ratón, se demostró que la presencia de eosinófilos es crítica para la eliminación del parásito *Brugia malayi* del tejido y del torrente sanguíneo. Al inyectar ratones con el antígeno de *B. malayi*, los eosinófilos recuperados poseen una expresión elevada de MHC de clase II en su superficie (143), demostrando que los mismos podrían expresar marcadores característicos de las APCs según el ambiente inmunológico desarrollado en dicha infección.

En otras infecciones causadas por helmintos, no se han encontrado evidencias del rol determinante de los eosinófilos. Tal es el caso de *S. mansoni*, donde no se registraron diferencias en la respuesta inmune, la carga parasitaria o la deposición de huevos en ratones PHIL o Δ dblGATA en comparación a los salvajes. Tampoco se vio afectada la formación de granulomas al eliminar los eosinófilos (144). Dichos granulomas se forman en el hígado, a consecuencia de la deposición de huevos (143). Asimismo, los eosinófilos no resultaron indispensables para el desarrollo de la respuesta inmune intestinal de tipo Th2 contra *Trichuris*

muris, ni para la expulsión de gusanos en ratones Δ dbIGATA (146, 147).

En cuanto al daño causado por los helmintos en diferentes tejidos, la función de los eosinófilos resulta dispar. Como se mencionó previamente, los eosinófilos no poseen influencia en el desarrollo de granulomas hepáticos en animales infectados con *S. mansoni* (145). De igual forma, tampoco poseen un rol en proteger al hígado del daño causado por la larva de *Trichinella* al migrar, pero parece que si estarían protegiendo al músculo (148). En la tabla 2 se resume el efecto de los eosinófilos sobre la infección por algunos parásitos helmintos.

Tabla 1.2. Efecto de la depleción de eosinófilos en infecciones por parásitos helmintos en ratones PHIL o Δ dbIGATA.

Helminto	Efecto	Referencias
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Aumento de producción de huevos en fase intestinal	140
<i>Brugia malayi</i>	Aumento de carga parasitaria	143
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Disminución de fecundidad parasitaria	113
<i>Schistosoma mansoni</i>	Sin impacto	145

Función de los eosinófilos durante la fasciolosis

Existen varios reportes que indican el reclutamiento de eosinófilos en infecciones experimentales con *F. hepatica*, sugiriendo que estas células participan en la respuesta inmune durante la fasciolosis. En un estudio realizado por el grupo de Zafra se inmunizaron cabras con un antígeno proveniente de *Fasciola*, la catepsina L1, y luego se desafió a estos mismos animales con *F. hepatica*. Luego de 7 a 9 días post-infección, se observó un mayor reclutamiento de eosinófilos en el hígado, rodeando a los gusanos de *Fasciola* (Figura 1.9) en animales infectados en comparación con animales no infectados. Por lo tanto, en este estudio se evidenció que la respuesta inmune mediada por eosinófilos podría estar teniendo un rol importante en la respuesta inmune efectiva contra *Fasciola*, aunque esto no fue demostrado directamente (149).

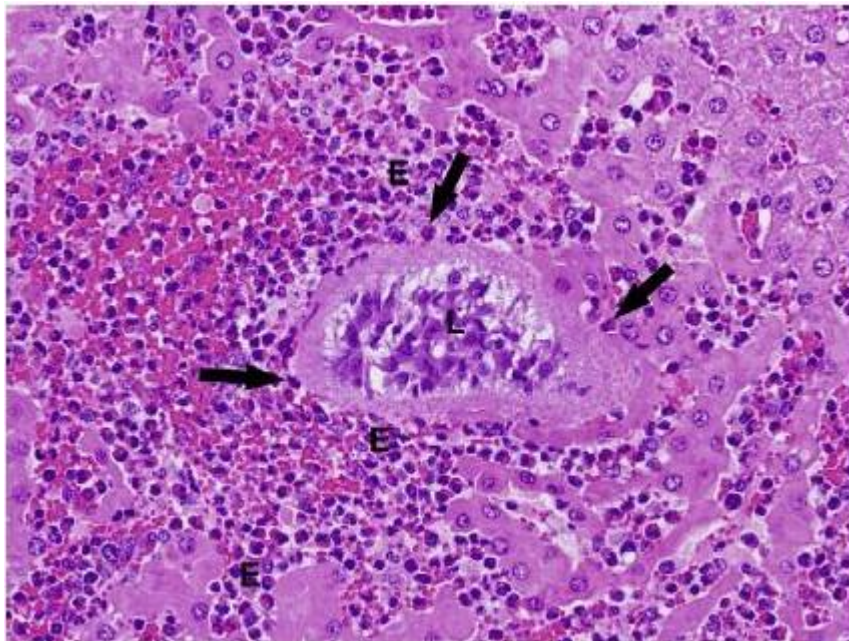


Figura 1.9. Hígado de cabra inmunizada con catepsina L1 y desafiada con *F. hepatica*. Se observa una larva de *Fasciola* (L) migrando a través del hígado, rodeada de un infiltrado de eosinófilos. Extraído de (149).

En otro trabajo realizado por Jedlina et al. Se estudió el reclutamiento de células a la cavidad peritoneal de ratas infectadas con *F. hepatica* a los 2, 4 y 7 días post-infección. Los resultados obtenidos indicaron que un gran número de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos eran reclutados a la cavidad peritoneal de los animales infectados. Además, se observó que los eosinófilos de los animales infectados generan gran cantidad de óxido nítrico (NO) (150). Sin embargo, a pesar de haberse detectado la presencia de eosinófilos, no se ha demostrado directamente su función en la eliminación de *F. hepatica* o en el desarrollo de la respuesta inmune. En este sentido, algunos reportes han indicado la presencia de apoptosis en eosinófilos durante la infección por *F. hepatica*. Escamilla et al., detectaron numerosos eosinófilos que expresan caspasa-3 durante la fasciolosis experimental en ovejas. Dichos

eosinófilos apoptóticos fueron encontrados tanto en lesiones necróticas hepáticas como en los ductos biliares (151). En otro trabajo realizado por Serradell et al., se observó apoptosis en eosinófilos en el hígado de ratas luego de 21 días post infección por *F. hepatica*. Además, se reportó que los productos de excreción secreción de *Fasciola* eran capaces de inducir la apoptosis de eosinófilos, mediante la activación de proteínas tirosin-quinazas y caspasas (152), sugiriendo que la inducción de apoptosis de eosinófilos podría constituir una estrategia de supervivencia del parásito para residir en el huésped.

Eosinófilos en el hígado: función en fibrosis y reparación del tejido

Tradicionalmente, la fibrosis tisular se encuentra asociada con una respuesta inmune de tipo Th2. La misma se caracteriza por una alta producción de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (153). En este sentido, muchos estudios sugieren un rol crítico de macrófagos activados que responden a las citoquinas IL-13 e IL-4 en la reparación del tejido y la disminución de la respuesta inflamatoria (154). Además de los macrófagos, numerosas células del sistema inmune se han visto implicadas en la reparación tisular, incluyendo a los eosinófilos, mastocitos, basófilos e ILC2s (155).

El hígado es un órgano metabólico central, muy vascularizado, con baja velocidad lineal de flujo sanguíneo y endotelio capilar fenestrado, lo que permite el intercambio activo de sustancias entre la sangre y el tejido (156). Los antígenos provenientes de la dieta están ingresando al hígado en forma permanente, por lo que la respuesta inmune en este órgano es fundamentalmente tolerogénica. Esta respuesta puede volverse inflamatoria en el caso de infecciones por patógenos, cáncer hepático o reacción adversa a trasplantes. Dicha inflamación puede comenzar a generar fibrosis en el tejido, especialmente si es crónica.

Existen varias citoquinas que poseen un papel importante en la fibrosis hepática, como por ejemplo TGF- β . Como ya se ha reportado, el hígado posee una gran capacidad de regeneración de tejido que resulta vital para la homeostasis de este órgano. En este sentido, el TGF- β modela la arquitectura hepática al tener un efecto citostático y apoptótico sobre los hepatocitos, regulando así su homeostasis. En cuanto a la fibrosis, el TGF- β promueve la activación de los fibroblastos y la producción de matriz extracelular, lo cual resulta esencial para el proceso de fibrosis y cicatrización. Entre las células que producen TGF- β en el hígado se encuentran los eosinófilos y macrófagos (157).

En cuanto al rol específico de los eosinófilos en el desarrollo de la fibrosis, el mismo resulta controversial. Por una parte, en un estudio donde se utilizaron ratones IL-5 *knock out* infectados con *S. mansoni*, se observó una marcada reducción de la fibrosis hepática, acompañado de una disminución en los niveles de la citoquina IL-13 (158). Sin embargo, en estudios posteriores utilizando ratones depletados de eosinófilos como Δ dblGATA o PHIL no se encontraron diferencias en el nivel de citoquinas de tipo 2, desarrollo de granulomas o fibrosis luego de la infección con el mismo parásito (145). Recientemente se han asociado a los eosinófilos con la regeneración del tejido hepático luego de una injuria. Específicamente, se observó que los mismos regulaban la regeneración hepática luego de una hepatectomía produciendo IL-4 e IL-13, que actúan como mitógenos de los hepatocitos (159).

Por lo tanto, el papel de los eosinófilos en la reparación tisular resulta dual, ya que por un lado podría estimular la regeneración del epitelio y diferentes tejidos al constituir una fuente de IL-4, la cual estimula a las células epiteliales y parenquimatosas a proliferar. Contrariamente, en algunas patologías donde se registra un gran reclutamiento de eosinófilos al tejido y una gran polarización hacia una respuesta inmune Th2, por ejemplo en infecciones helmínticas, puede generarse una excesiva respuesta inflamatoria que deriva en daño tisular y fibrosis. Particularmente en cuanto a *F. hepatica*, el papel reparativo de los eosinófilos en el hígado durante la infección aún no ha sido investigado.

Hipótesis

Considerando, como mencionamos anteriormente, que en algunas infecciones por helmintos, los eosinófilos parecen jugar un rol determinante, ya sea favoreciendo o perjudicando al parásito, así como también su capacidad de mediar diversas funciones inmunomoduladoras, la hipótesis de esta tesis es que los eosinófilos poseen propiedades inmunomoduladoras durante la infección por *F. hepatica* que promueven una respuesta inmune más efectiva en eliminar al parásito. Esta hipótesis se apoya también en el hecho de que los ratones infectados por *F. hepatica* presentan un alto número de eosinófilos en hígado y en la cavidad peritoneal.

Objetivo General

El objetivo general de esta tesis consistió en caracterizar a los eosinófilos durante la infección experimental por *F. hepatica* e investigar si los mismos poseen efectos moduladores sobre la respuesta inmune desarrollada durante la infección y si promueven o limitan el daño hepático ocasionado por *F. hepatica*.

Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de este trabajo consistieron en:

- Identificar a las células Siglec-F⁺ F4/80^{int} (eosinófilos) durante la infección por *F. hepatica*.
- Caracterizar a los eosinófilos provenientes de animales infectados, tanto por citometría de flujo como por microscopía.
- Evaluar si los eosinófilos son capaces de regular la respuesta celular T.
- Estudiar si los eosinófilos contribuyen a la respuesta humoral desarrollada durante la infección.
- Evaluar si los eosinófilos limitan o promueven el daño hepático ocasionado por *F. hepatica*.

2 - Materiales y Métodos

Modelo murino de infección por *F. hepatica*

Para la realización de este trabajo se utilizó un modelo experimental murino de infección por *F. hepatica* ya caracterizado y puesto a punto en nuestro laboratorio (160, 161, 191). En este modelo, ratones son infectados en forma oral con metacercarias (el estadio infectivo de *F. hepatica*). Las metacercarias se desenquistan en el intestino, y de esta forma emergen los parásitos juveniles recién desenquistados (NEJs). En un modelo de infección *ex vivo* en ratas, se ha reportado la presencia de metacercarias y algunos NEJs en el estómago luego de 1 hora de infección. Luego de 2 a 4 horas de infección, los NEJs podían ser encontrados a lo largo de todo el intestino, si bien se observó un número mucho menor en el colon. A partir de las 6 horas post-infección, pocos NEJs podían encontrarse en el intestino, indicando que la fase de migración intestinal se encontraba en sus etapas finales (162). Una vez en el peritoneo, los NEJs ingresan al parénquima hepático, para finalmente convertirse en parásitos adultos y residir en los ductos biliares. En el caso de nuestro modelo de infección por *F. hepatica*, se detectaron individuos adultos en el parénquima hepático por técnicas histológicas a los 21 días post-infección, y se realizó un conteo del número de parásitos, obteniéndose un número de 3 a 5 parásitos por órgano (191). Sin embargo, no se cuenta con la información del tiempo que tarda el parásito en llegar al hígado en nuestro modelo, ni si a los 21 dpi ya no se encuentra ningún parásito en el peritoneo.

Se utilizaron ratones hembras BALB/c de 6 a 10 semanas de edad. Los ratones fueron adquiridos en la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca y mantenidos en la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE, Facultad de Medicina) en un ambiente controlado, con temperatura entre 19 y 21 °C y ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los animales fueron alojados en jaulas con filtro y recibieron agua y ración estéril, administradas en condiciones *ad libitum*. Todos los experimentos animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Facultad de Medicina, protocolo No. 070153-000820-17).

Grupos de 3 a 5 ratones (dependiendo del experimento) fueron infectados por vía oral con 5 a 15 metacercarias de *F. hepatica* (producidas en Danatro Martínez y Alcanatra Crapuchett, Nuevo Centro, Clínica Veterinaria). Luego de 1, 5, 7, 15 o 21 días del comienzo de la infección, los animales fueron sangrados y sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente se obtuvieron las células de la cavidad peritoneal (PEC, por su sigla en inglés *Peritoneal exudate cells*), bazo, hígado y ascitis (líquido) de la cavidad peritoneal. Los PECs fueron obtenidos inyectando 10 ml de Buffer Fosfato Salino conteniendo Cloruro de Sodio NaCl 0,137 M, Cloruro de Potasio KCl 0,0027 M, Fosfato de Sodio Na₂HPO₄ 0,01 M, y Fosfato de Potasio KH₂PO₄ 0,0018 M (PBS, del inglés *Phosphate Buffer Saline*) previamente enfriado en la cavidad peritoneal de animales infectados, y luego extraído. Los órganos y las células obtenidas fueron posteriormente procesadas para su análisis por citometría de flujo, cultivo celular o PCR cuantitativa.

La gravedad de la infección fue determinada mediante un score clínico, el cual se detalla en la Tabla 2.1. El score mínimo es de 0 mientras que el máximo es de 10 puntos.

Tabla 2.1 Score clínico para ratones infectados con *Fasciola hepatica*. Extraído y modificado de (160).

Ascitis	Bazo	Número de lesiones/lóbulo hepático	Lóbulos hepáticos afectados
0 - contenido celular normal	0 - Normal	0 - Sin lesiones	0 - Sin lóbulos afectados
1 - contenido celular medio	1 - Esplenomegalia (< 2x)	1 - < 3 lesiones por lóbulo	1 - 1 lóbulo hepático afectado
2 - contenido celular alto	2 - Esplenomegalia (> 2x)	2 - > 3 lesiones por lóbulo	2 - > 2 lóbulos hepáticos afectados
3 - contenido celular alto y sangre		3 - Afección completa del lóbulo	

Evaluación del daño hepático

La determinación del daño hepático causado por *F. hepatica*, se llevó a cabo a través de la cuantificación de la actividad de la enzima alanina-transaminasa (ALT) en suero, utilizando un kit comercial (SpinReact). Dicho ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se preparó la mezcla con 4 volúmenes del reactivo1 (R1) y 1 Vol del reactivo 2 (R2). Se colocaron 20 µL de suero en cada pocillo, seguido de 200 µL de la mezcla. Se procedió a la medición de la absorbancia a 340 nm, y se realizaron 5 mediciones de absorbancia consecutivas con espacio de 1 min entre cada medición.

Se calculó la diferencia entre las absorbancias y el promedio de las diferencias en las absorbancias por minuto ($\Delta A/min$). La actividad específica fue calculada utilizando la siguiente ecuación: $U/L \text{ de ALT} = \Delta A/min \times 1750$.

Para evaluar el daño hepático también se realizaron tinciones de hematoxilina eosina de cortes de tejido hepático de animales infectados y no infectados. Para este fin, se conservaron hígados en Polyfreeze (Sigma) y se realizaron cortes de 10 µm con crióstato. Seguidamente, se aplicó el protocolo de tinción con hematoxilina y eosina, que incluye hidratar las muestras mediante sucesivas pasadas por etanol 100, 95 y 70 %, tinción con hematoxilina por 5 min y luego con eosina por 2 min. Finalmente, se deshidrataron las muestras pasándolas nuevamente por etanol, se limpiaron con xileno por 6 min y se montaron con reactivo Permunt (Fisher Chemical). Las láminas se analizaron en microscopio óptico Zeiss Axio Lab.A1.

Obtención de suspensiones celulares de esplenocitos y leucocitos hepáticos

Para obtener esplenocitos a partir de bazos de ratones infectados y no infectados, se disgregaron mecánicamente los bazos con láminas de vidrio. A continuación, la suspensión celular obtenida se lavó con PBS y se lisaron los glóbulos rojos con una solución hipotónica conteniendo $MgCl_2$ 1 M, NaCl 1 M y Tris-HCl 1 M pH 7,6. Seguidamente, se realizaron dos lavados más con PBS, centrifugando a 1500 rpm por 5 min, utilizando una centrífuga Sorvall ST16R (Thermo Scientific). Finalmente, se procedió al conteo celular, utilizando una cámara de Neubauer.

Para la obtención de los leucocitos hepáticos, se perfundieron los hígados inyectando PBS en la vena cava abdominal y cortando la vena suprahepática, hasta que los hígados se aclararon. A continuación, se disgregaron los hígados mecánicamente, y se los dejó decantar 15 min en hielo. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se lo centrifugó a 1300 rpm por 7 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 6 ml de Percoll 35%. Se centrifugó la suspensión celular a 600 g por 20 min a 20°C, sin aceleración y sin freno. Se retiró el sobrenadante, se lisaron los glóbulos rojos y se lavaron las células con PBS, procediendo a su conteo.

Preparación de lisados de *F. hepatica*

Se obtuvieron gusanos adultos de *F. hepatica* residentes en los ductos biliares de hígados vacunos infectados, provenientes de ejemplares del Frigorífico Carrasco. Para producir el extracto total parasitario, los gusanos adultos fueron lavados en PBS pH 7,4, disgregados mecánicamente en presencia de inhibidores de proteasas conteniendo fluoruro de 4- (2-aminoetil) bencenosulfonilo (AEBSF) 2 mM, aprotinina 0,3 μ M, bestatina 116 μ M, E-64 14 μ M, leupeptina 1 μ M y ácido ethylenediaminetetraacético (EDTA) 1 mM (Sigma-Aldrich) con ayuda de un homogeneizador de tejidos y posteriormente centrifugado a 40.000 g por 60 minutos. El sobrenadante fue dializado contra PBS por al menos 48 horas. Posteriormente, la concentración proteica del lisado obtenido (FhTE) fue cuantificada utilizando el método del ácido bicinónico (BCA) (163) y el mismo se guardó a -80°C . Los niveles de endotoxinas fueron determinados utilizando el kit Limulus Amebocyte Lysate Pyrochrome (Associates of Cape Code). Los lisados presentaron niveles de endotoxinas similares al medio de cultivo.

Cuantificación de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el método BCA. Se colocaron 10 μ L de muestra por pocillo en diferentes diluciones de PBS y luego 200 μ L de la mezcla de reacción, constituida por BCA (Sigma Aldrich, US) y sulfato de cobre al 4 % en una relación 50:1. Posteriormente, se incubaron las muestras 30 min a 37°C , para luego medir la absorbancia de la formación del complejo a 570 nm.

Para el procesamiento de datos se utilizó una curva de calibración utilizando Seroalbúmina Bovina (BSA) (Sigma Aldrich) en PBS. Los valores fueron extrapolados utilizando el rango lineal de la curva.

Extracción de ARN, cuantificación y medida de pureza

Se realizó extracción de ARN total de tejido hepático, eosinófilos sorteados y células de la cavidad peritoneal de ratones no infectados.

En el caso del tejido hepático, el mismo fue almacenado en 500 μ L de Tri-reagent (Sigma-Aldrich) y disgregado mecánicamente, e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se agregaron 125 μ L de cloroformo, se vortexeó por 15 s y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Luego de la incubación se obtuvieron dos fases. La fase superior o acuosa se pasó a otro eppendorf y se agregaron 500 μ L de isopropanol por cada mL de Tri-reagent utilizado. Se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 10 min a 12000 g a 4°C . El pellet obtenido en esta etapa se corresponde con el ARN. El mismo se lavó con 1 mL de etanol 75% (preparado con H_2O tratada con pirocarbonato de dietilo DEPC), se vortexeó y se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C . Se dejó secar el pellet y se resuspendió en 30 μ L de H_2O – DEPC previamente calentada a 55°C .

Para otras muestras de hígado se utilizó el RNeasy Mini Kit de Qiagen, según las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se resuspendió el tejido en buffer de lisis RLT y se disgregó. Luego se le agregó un volumen equivalente de etanol 70% y se vortexeó. Seguidamente, se transfirió la muestra a columnas de purificación de ARN, incluidas en el kit. Dichas columnas se encontraban dentro de un eppendorf de 2 mL. Se centrifugó por 15 s a 8000 g y se descartó el líquido que quedó en el eppendorf. A continuación, se agregaron 700 µL del buffer RW1 a la columna, se centrifugó por 15 s a 8000 g y se descartó el líquido del tubo. Posteriormente, se realizaron dos lavados con buffer RPE centrifugando por 15 s a 8000 g descartando el líquido. Finalmente, se colocó la columna en un nuevo tubo eppendorf y se procedió a la elución del ARN, agregando 30 µL de agua ARNasa free y centrifugando a 8000 g por 1 min.

Luego de la extracción, fue necesario cuantificar el ARN obtenido. Dicha cuantificación se realizó por espectroscopía, a través de la medida de absorbancia a 260 nm. También se determinó la pureza del ARN extraído por medio de la relación entre la absorbancia a 260 nm (a la que absorben los ácidos nucleicos) y la absorbancia a 280 nm (a la que absorben las proteínas conteniendo aminoácidos aromáticos). En el caso del ARN, esta relación debe ser mayor a 1,7. Las medidas de cuantificación y grado de pureza se realizaron en un equipo Nanodrop. La unidad del ARN obtenido fue de ng/µL.

Síntesis de ADN copia (ADNc)

Para sintetizar el ADNc, se partió del ARN extraído previamente por ambos métodos. Se utilizó el kit SensiFAST cDNA Synthesis de Bioline. En primer lugar se realizó una mezcla de reacción para sintetizar ADNc, que incluye TransAmp Buffer, la enzima Transcriptasa Reversa a 200 U/µL y 1 µg de ARN que se calculó según concentración obtenida en el Nanodrop. Se utilizó el siguiente programa: 25°C por 10 min, 42°C por 15 min, 48°C por 15 min y 85°C por 5 min. El ADNc fue almacenado a -20°C o se procedió a realizar la qRT-PCR. El ADNc fue realizado en un termociclador T Gradient Thermocycler de la marca Biometra.

Determinación de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se realizó qRT-PCR utilizando el kit SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline) para determinar la expresión génica de las moléculas que se detallan en la tabla 2.2. Además, se muestran los *primers* específicos que se utilizaron para amplificar dichos genes.

Tabla 2.2. *Primers* específicos utilizados. Se detalla la secuencia y la temperatura de melting (Tm) utilizada.

Gen	Primer	Secuencia 5' - 3'	Tm (°C)
IL-10	IL-10-F	TTCCCAGTCGGCCAGAGCCA	64
IL-10	IL-10-R	GGGGAGAAATCGATGACAGCGCC	62
TGF-β	TGF-β-F	AACAATTCTGGCGTTACCTT	55
TGF-β	TGF-β-R	CTGCCGTACAACCTCCAGTGA	57
GAPDH	GAPDH-F	CTGAGAACGGGAAGCTTG	60
GAPDH	GAPDH-R	CCTGCTTCACCACCTTCTTG	60
FIZZ1	FIZZ1-F	CACCTCTTCACTCGAGGGACAGTTG	60
FIZZ1	FIZZ1-R	GGTCCCAGTGCATATGGATGAGAC	59
IL-4	IL-4 F	TGCGAAGCACCTTGGGAAGCCC	63
IL-4	IL-4R	AAGTCACAGGAGAAGGGACGCC	63

En primer lugar, se realizó la mix de PCR conteniendo SYBR-Green, 200 nM de *primer* sentido (F), 200 nM de *primer* anti-sentido (R), y cantidad de H₂O – DEPC necesaria para llegar a 20 µL (según recomendación del proveedor). Se dispensó 9 µL de mix y se colocó 1 µL de ADNc por pocillo. Por cada juego de *primers* se realizó un control donde no se colocó ADNc. La qRT-PCR se realizó en un termociclador Eco-Illumina. El programa utilizado fue: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C 15 s, 56°C-63°C 30 s, 72°C 30 s. Finalmente, se programó una extensión final de 72 °C por 10 min. El análisis de datos se realizó con el programa EcoStudy y se utilizó el gen constitutivo GAPDH para calcular la expresión relativa de los genes antes mencionados, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{ExpresiónRelativa} = 2^{-\Delta}, \text{ donde } \Delta Cq = Cq_{\text{GAPDH}} - Cq_{\text{gene de interés}}$$

Análisis de leucocitos por citometría de flujo

Las células obtenidas de la cavidad peritoneal, del bazo y los leucocitos hepáticos fueron analizados por citometría de flujo. En primer lugar, fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS con 2% de suero fetal bovino (SFB) y 0,1% de azida de sodio (PBS/SFB). Se colocaron 200.000 células por pocillo.

Para la tinción de moléculas de superficie, las células fueron incubadas con los anticuerpos contra moléculas membranas correspondientes (Tabla 2.3) diluidos en PBS/SFB por 30 min a 4 °C. Luego, se lavaron las células dos veces con PBS/SFB y se resuspendieron hasta su análisis.

Para el análisis de moléculas intracelulares, luego de la marcación de las moléculas de superficie, se fijaron las células con Cytofix (Biolegend) durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se permeabilizaron al incubar con Permwash (Biolegend) y se incubaron con los anticuerpos correspondientes diluidos en Permwash durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron y se resuspendieron en PBS/FBS hasta su análisis.

Con el fin de analizar la producción de citoquinas, se realizó primeramente la marcación membranaria seguida de la permeabilización de suspensiones celulares previamente incubadas con Brefeldina (3 µg/mL) y PMA (0,1 µg/mL) por 6 h a 37 °C. Posteriormente, se lavaron las células y se les realizó la permeabilización explicada en el párrafo inmediatamente superior y posterior incubación con anticuerpos específicos de citoquinas.

Las poblaciones celulares fueron analizadas utilizando citómetros Cyan (Dako), Accuri C6 o Accuri C6 Plus (BD Biosciences), utilizando los softwares: Summit, FlowJo y Accuri C6.

Tabla 2.3. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

Moléculas Membranarias				Moléculas Intracelulares			
Especificidad	Clon	Conc. Final (µg/mL)	Empresa	Especificidad	Clon	Conc. Final (µg/mL)	Empresa
Siglec-F	E50-2440	0,6	BD Biosciences	Foxp3	FJK-16s	2	eBioscience
F4/80	BM8	1	Biolegend	IL-4	11B11	4	Biolegend
CD11b	M1/70	0,4	BD Biosciences	IFN-γ	XMG1.2	4	Biolegend
Sirp-α	P-84	0,8	Biolegend	IL-10	JES5-16E3	4	Biolegend
CCR3	J073E5	1	Biolegend				
Ly6G	RB6-8C5	0,3	eBioscience				
Ly6C	HK1.4	1	eBioscience				
CD11c	N418	0,6	Biolegend				
CD80	16-10A1	0,4	eBioscience				
CD4	GK1.5	0,3	Biolegend				
CD40	HM40-3	1	eBioscience				
CD64	X54-5/7.1	1	eBioscience				
I-A/I-E	M5/114.15.2	0,1	Biolegend				
CD8	53-6.7	0,25	Biolegend				
CD25	PC61	0,16	Biolegend				
CD162	2PH1	0,6	eBioscience				
CD44	IM7	0,5	Biolegend				
CD3	17A2	0,3	eBioscience				

Estudio de la morfología de eosinófilos con tinción de May-Grunwald Giemsa

Para estudiar la morfología de las células provenientes de la cavidad peritoneal e hígado de animales infectados y controles se utilizó la tinción de May-Grunwald Giemsa. Dicha tinción consiste de eosina, azul de metileno, metanol y tinción de Giemsa. Los núcleos celulares aparecen típicamente más oscuros que el citoplasma, el cual varía de color entre rojo, azul y violeta, dependiendo del tipo celular (164). En particular, los eosinófilos se observan con el núcleo azul oscuro y el citoplasma de color rojo intenso. La misma se realizó por la técnica de goteo, donde se aplicó en primer lugar la tinción de May-Grunwald (Grupo Benzo) por 1 min. Luego, se enjuagó con agua destilada. Seguidamente, se le aplicó la tinción Giemsa (Química Clínica Aplicada) por 1 min, lavándolo finalmente con agua destilada. Se utilizó glicerol para el montado de las láminas. Las células se visualizaron en un microscopio Nikon Eclipse E400.

Análisis de leucocitos por Inmunofluorescencia

La confirmación de la expresión de ciertos marcadores moleculares tanto en las células del PEC e hígado de animales infectados y controles, se realizó por inmunofluorescencia directa. Primeramente las células se colocaron en láminas de vidrio previamente silanizadas. El proceso de silanizado se realizó de la siguiente manera: en primer lugar, se incubaron las láminas en acetona por 15 min y luego en (3-Aminopropil) triethoxy-silano (Sigma-Aldrich) diluido en acetona al 2%. Finalmente, se realizaron dos lavados con acetona y dos lavados con agua destilada de 1 min cada uno. Se colocaron 50.000 células por lámina y se permeabilizaron con Tritón X-100 en PBS al 0,1% durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se bloquearon con 5% de BSA en PBS, por 1 h a la misma temperatura. Seguidamente, las células se incubaron con los anticuerpos ya unidos a sus respectivos fluorocromos, toda la noche a 4°C. Las diluciones se realizaron en PBS conteniendo 0,5% de BSA.

A continuación, se detallan los anticuerpos utilizados en esta sección junto con su concentración (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Anticuerpos específicos contra diferentes moléculas membranas utilizadas en inmunofluorescencia en la presente tesis.

Especificidad	Clon	Conc. Final ($\mu\text{g/mL}$)	Empresa
Siglec-F	E50-2440	4	BD Biosciences
F4/80	BM8	2	Biolegend
CD11b	M1/70	1,2	BD Biosciences
CCR3	J073E5	2	Biolegend
Ly6G	HK1.4	1,5	eBioscience
CD11c	N418	1,2	Biolegend
CD44	IM7	2	Biolegend
I-A/I-E	M5/114.15.2	0,4	Biolegend
CCR2	SA203G11	2,5	Biolegend
IL-33R α	DIH9	4	Biolegend
CD162	2PH1	1	BD Biosciences

Al día siguiente, se lavaron las células tres veces con PBS, y luego se marcaron con 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) a 5,7 μM por 5 min a temperatura ambiente, para permitir la visualización de los núcleos. Seguidamente, se realizaron tres lavados adicionales con PBS y se procedió al montaje de las láminas. Para el mismo se utilizó medio oleoso Fluoromount (Sigma-Aldrich). Las células se observaron utilizando el microscopio confocal Olympus XI 81 Spinning Disk, Leica TCS LSI o Leica SP5.

Detección de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS/RNS) por citometría de flujo

Con el fin de detectar la producción de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno en células de la cavidad peritoneal, esplenocitos y leucocitos hepáticos de animales infectados y control, se colocaron 200.000 células por pocillo, en una placa de 96 pocillos. Luego, fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS con 2% de suero fetal bovino (SFB) y 0,1% de azida de sodio (PBS/SFB).

A continuación, se incubaron las células con la sonda 2',7' – dichlorofluorescein diacetato (Sigma-Aldrich), la cual fluoresce en presencia de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno que se generan en la célula. Dicha sonda se utilizó a una concentración de 0,08 mg/ml, y se incubó en PBS por 30 min a 37°C. Luego, las células se lavaron dos veces en PBS con PBS/SFB, para ser analizadas inmediatamente en un citómetro Accuri C6 o Accuri C6 Plus (BD Bioscience).

Ensayo de depleción de eosinófilos

Para estudiar el rol inmunomodulador de los eosinófilos durante la infección por *F. hepatica*, se llevó a cabo un ensayo de depleción de eosinófilos utilizando un anticuerpo monoclonal específico para la molécula Siglec-F, altamente expresada en eosinófilos (165, 166). Para ello, se establecieron dos grupos de 9 ratones cada uno: 1) animales infectados inoculados con un anticuerpo α -Siglec-F (BD Biosciences), y 2) animales controles, que recibieron un anticuerpo control anti-IgG2a de rata de isotipo κ , específico para la peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) (BD Biosciences).

Se administraron 15 μ g de ambos anticuerpos por vía intraperitoneal el día anterior a la infección, y a los días 1, 3, 6, 9, 13 y 16 después de la infección.

Al día 0 ambos grupos de ratones fueron infectados con 10 metacercarias de *F. hepatica* por vía oral. Los animales fueron sacrificados al día 21 y diferentes muestras biológicas fueron extraídas y analizadas por citometría de flujo, ELISA y qRT-PCR.

Determinación del título de anticuerpos específicos por ELISA

Para evaluar la presencia de anticuerpos específicos de *F. hepatica* en el suero de animales infectados a los 21 dpi y no infectados, así como depletados de eosinófilos, se realizó un test de ELISA indirecto, utilizando placas de ELISA NuncF (Roskilde, Dinamarca). Las mismas fueron sensibilizadas con 2 μ g de extracto total de *F. hepatica* (FhTE) por pocillo, durante toda la noche a 4°C. Luego, se bloqueó la placa con una solución de PBS gelatina 1%, por 1 h a 37°C. Seguidamente, se colocaron los sueros, a una dilución inicial de 1 en 100 y luego diluciones seriadas hasta llegar a 1 en 800. Los sueros se incubaron durante 2 h a 37°C. La detección de los anticuerpos específicos IgG, IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 en suero se realizó con una anti-inmunoglobulina de ratón conjugada a peroxidasa específica para cada uno de estos isotipos. Se las incubó 1 h a 37°C. Finalmente, se procedió al revelado, con una solución de sustrato o-fenilendiamina (OPD) 0,5 mg/mL y 0,12% de H₂O₂ en Buffer citrato- fosfato 0,1 M pH 5. La reacción se detuvo por el agregado de HCl 3 M y luego se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm en un lector de ELISA Thermo Scientific MultiskanGo.

Estudio de la respuesta inmune celular

i) Ensayo de proliferación de linfocitos T: Para estudiar el efecto de la depleción de eosinófilos en la polarización de linfocitos T en el bazo, se obtuvieron suspensiones celulares de bazo (esplenocitos). Los esplenocitos ($0,5 \times 10^6$ por pocillo) fueron cultivados en medio RPMI completo, conteniendo SFB 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomina 0,1 mg/mL y β -mercaptoetanol 0,05 mM), en presencia de lisado parasitario (FhTE, 75 μ g/mL), Conavalina A (ConA, 2,5 μ g/mL), y anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 (1 μ g/mL, clones 145-2C11 y 37.51 respectivamente) por 5 días a 37 °C y 5 % CO₂. Luego de este tiempo, se determinó la concentración de las citoquinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA.

ii) Determinación de citoquinas mediante ELISA: Con el fin de evaluar los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de diferentes experimentos de proliferación de linfocitos T, se llevó a cabo un ELISA Sándwich específico. Para ello, se sensibilizaron placas de ELISA NuncF Maxisorp con anticuerpos primarios específicos para cada citoquina (BD Bioscience) en buffer fosfato 0,1 M pH 9,6 durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se bloquearon las placas con PBS Gelatina 1%, para luego colocar los sobrenadantes de cultivo a diferentes diluciones según la citoquina estudiada. Se incubaron los mismos durante 1 h a 37°C, al igual que el bloqueo. Se utilizaron diferentes diluciones para los sobrenadantes, dependiendo de la citoquina. Además, se incluyó una curva de calibración utilizando como estándar cada citoquina recombinante. Seguidamente, se agregó en cada pocillo el anticuerpo secundario conjugado a biotina, y se incubó durante 1 h a 37°C. La streptavidina-peroxidasa fue incubada durante 45 min a 37°C. Finalmente, se procedió al revelado con la misma solución detallada anteriormente (o-fenilendiamina (OPD) 0,5 mg/mL y 0,12% de H₂O₂ en Buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 5).

Análisis de citoquinas y quimioquinas presentes en ascitis y suero

Paralelamente, se buscó determinar el nivel de citoquinas en la ascitis y suero obtenidas tanto de animales infectados como no infectados. Para ello, también se realizó un ELISA Sándwich específico como fue descrito anteriormente, a excepción de la sensibilización, la cual se realizó en buffer carbonato pH 9,6. Además, las muestras fueron incubadas durante toda la noche. Las citoquinas analizadas fueron IL-5 y TSLP, así como la quimioquina CCL11.

Obtención de eosinófilos por clasificación celular

Con el fin de obtener eosinófilos purificados a partir de suspensiones celulares de PEC e hígado, se utilizó la técnica de clasificación celular mediante sorting. En primer lugar, se obtuvieron suspensiones celulares de PEC e hígado y se filtraron. Seguidamente, se llevaron las suspensiones celulares a una concentración de 8×10^6 células/mL. Se marcaron las células con anticuerpos anti-Siglec-F y anti-F4/80 por 30 min a 4°C. Los eosinófilos fueron sorteados en base a la expresión de Siglec-F y F4/80, seleccionando la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ y F4/80^{int}. Las células sorteadas fueron obtenidas en tubos conteniendo SFB. En todos los casos, el sorting se realizó a 4°C, en citómetro BD FACSAria Fusion Cell Sorter (BD

Biosciences). La pureza obtenida de los eosinófilos fue mayor al 95% en todos los casos. Los eosinófilos purificados fueron utilizados para ensayos de co-cultivo celular, qRT-pCR, inmunofluorescencia o tinciones histológicas.

Generación de eosinófilos derivados a partir de células de la médula ósea

Se generaron eosinófilos *ex vivo* cultivando células de la médula ósea de ratones infectados. Dichas células se obtuvieron de los fémures y peronés de ratones infectados, mediante extracción con jeringa de 1 ml en medio RPMI completo, y luego se llevaron a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml. Se colocaron 4×10^6 células por placa en un volumen total de 8 ml. El medio fue suplementado con 100 ng/ml de SCF recombinante de ratón y 100 ng/ml de FLT3-L recombinante de ratón (PeproTech). Luego de cultivar las células durante 4 días a 37 °C y 5% CO₂, se les agregó medio fresco conteniendo 10 ng/ml de IL-5 recombinante de ratón (PeproTech). Se cultivaron las células durante 10 días más a 37 °C y 5% CO₂. Se definieron a los BM-Eos como las células Siglec-F⁺.

Ensayo de degranulación de eosinófilos derivados de la médula ósea

La degranulación de los eosinófilos se determinó a partir de la medición de la liberación de la actividad peroxidasa, proveniente de las enzimas EPO y MPO. Se colocaron 100.000 eosinófilos derivados de la médula ósea en placas de 96 pocillos y se los estimuló con suero proveniente de animales infectados o no infectados (dilución 1/50, 1/150, 1/450) en presencia o ausencia de extracto total de *F. hepatica* (FhTE) 300 µg/ml. Además, se realizó un control positivo con H₂O₂. Este último reactivo genera lisis de los eosinófilos, pulsando todo su contenido al medio. Seguidamente, se colocaron 100 µl por pocillo de una solución de OPD realizada con 800 µl OPD 15 mM, 4 ml de buffer Tris pH 8 1 M y 4 µl de H₂O₂ 30% enrasada con agua destilada hasta 10 ml. Se incubó 1 h a 37°C y se midió la absorbancia a 492 nm.

Inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ por parte de eosinófilos

Con el fin de estudiar la capacidad de los eosinófilos provenientes de la cavidad peritoneal de animales infectados de inhibir la proliferación de linfocitos T CD4⁺, se realizó un ensayo de co-cultivo.

Primeramente se purificaron linfocitos T CD4⁺ a partir de esplenocitos de ratones BALB/c naive por selección negativa utilizando Nanobeads magnéticas, utilizando el kit MojoSort Mouse CD4 Naive T Cell Isolation Kit (Biolegend). Se obtuvo una suspensión celular de esplenocitos y se llevó a una concentración de 1×10^8 células/ml en MojoSort Buffer (SFB 0,5 %, EDTA 2 mM en PBS). Se agregaron 10 µL del cocktail de anticuerpos biotinilados cada 100 µL de suspensión celular, y se incubaron en hielo por 15 min. Luego, se agregaron 10 µL de NanoBeads conjugadas a streptavidina y se incubaron las células en hielo por 15 min. Seguidamente, se agregaron 2,5 mL de MojoSort Buffer, y se colocó el tubo en un magneto (StemCell Technologies) por 5 min. Pasado este tiempo, se volcó el líquido del tubo sin sacarlo del

magneto. Es en este paso donde se colectan las células de interés (linfocitos T CD4⁺). Se repitió este procedimiento dos veces más. Además de linfocitos T CD4⁺ purificados, también se realizó el ensayo utilizando esplenocitos totales.

Para analizar la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ o esplenocitos totales, se marcaron con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE del inglés, *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*). Para ello, las células (1x10⁷ células/ml) diluidas en PBS se incubaron con CFSE (Biolegend, 0,2 µg/ml) por 30 min a 37°C. Seguidamente, se realizaron dos lavados con PBS y se resuspendieron en medio RPMI completo.

En paralelo se purificaron eosinófilos provenientes de la cavidad peritoneal por dos métodos alternativos:

1) Sorting. (Ver sección “obtención de eosinófilos por clasificación celular”).

2) Beads Magnéticas: Se realizó un enriquecimiento en eosinófilos del PEC de animales infectados. Dicho enriquecimiento se llevó a cabo purificando las células CD11c⁺ del PEC mediante el kit de purificación MojoSort Mouse CD11c anti-APC Nanobeads (Biolegend). Esta estrategia de selección se basa en el hecho que en el PEC las células mayoritarias son CD11c⁺ Siglec-F⁻ (25-30 %) y CD11c⁻ Siglec-F⁺ (50-60 %) (160, 191). En primer lugar, el PEC y (1x10⁷ células/ml) diluido en MojoSort Buffer. Dichas células se incubaron con el anticuerpo anti-CD11c conjugado al fluoróforo allophycocyanina (APC) (Biolegend, 1 µg/mL) por 1 hora a 4°C. Se realizaron dos lavados con MojoSort Buffer. Las células (1x10⁸ células/ml) se incubaron con Nanobeads anti-APC (Biolegend) por 30 min en hielo, a razón de 10 µL cada 100 µL de células. Se agregaron 2,5 mL de MojoSort Buffer y se incubó en el magneto por 5 min. Pasado este tiempo, se descartó el líquido del tubo sin sacarlo del magneto. Posteriormente, se sacó el tubo del magneto y se colocaron 2,5 mL de MojoSort Buffer. Se repitió este procedimiento 2 veces más. Se obtuvieron dos fracciones celulares, enriquecidas en eosinófilos (Siglec-F⁺) o células CD11c⁺. Se analizó la pureza de la fracción de células Siglec-F⁺ mediante citometría de flujo obteniendo valores de entre 50 y 90 %, según el caso.

Finalmente, se co-cultivaron los linfocitos T CD4⁺ (200.000/pocillo) o esplenocitos totales (500.000/pocillo) marcados con CFSE, con los eosinófilos (sorteados o enriquecidos) en diferentes concentraciones (15.000, 50.000 y 150.000/pocillo) El cultivo se realizó con medio de cultivo RPMI completo conteniendo SFB 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 0,1 mg/ml y β-mercaptoetanol 0,05 mM. Los esplenocitos se estimularon con anticuerpos monoclonales anti-CD3 (1 µg/mL, clon 145-2C11), y anti-CD28 (1 µg/mL, clon 37.51), ConA (2,5 µg/mL) o incubados en medio de cultivo completo como control, durante 4 días a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente se obtuvo el sobrenadante de cultivo para medir citoquinas por ELISA y se marcaron las células con anticuerpos específicos de CD4 y CD8 para su posterior análisis por citometría de flujo.

Alternativamente, se realizó un ensayo similar pero con linfocitos T CD4 purificados provenientes de animales infectados en las mismas condiciones ya descritas.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el t-test de dos colas o ANOVA de dos vías seguido del test de Tukey mediante el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los niveles de significación estadística se consideraron como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

3 - Resultados

Los eosinófilos (células Siglec-F⁺ F4/80^{int}) son reclutados en altas cantidades a la cavidad peritoneal y al hígado de animales infectados por *F. hepatica*

Considerando estudios previos que indican a la molécula Siglec-F como un marcador específico de eosinófilos en ratón (167), el primer objetivo de esta tesis fue identificar a las células Siglec-F⁺ F4/80^{int} en PEC, bazo e hígado de ratones infectados por *F. hepatica*, así como analizar su morfología para identificar características celulares que se corresponden con eosinófilos. Estudios posteriores nos permitieron identificar a la molécula F4/80 como característica de eosinófilos cuando es expresada en baja o intermedia intensidad, en relación a los macrófagos o células dendríticas (que son F4/80^{hi} y F4/80^{int}, respectivamente) (160).

Para ello, infectamos ratones BALB/c con 10 metacercarias y analizamos la presencia de las células Siglec-F⁺ F4/80^{int} a los 21 dpi (días post-infección) en bazo, cavidad peritoneal e hígado. En los animales infectados, alrededor del 50% de las células presentes en la cavidad peritoneal luego de 21 dpi fueron Siglec-F⁺ F4/80^{int}, mientras que este porcentaje fue menor a 10% en animales no infectados (Figura 3.1 A). En el caso del bazo, la proporción de estas células fue mucho menor, siendo de alrededor de 1,3% en animales infectados y 0,5% en animales control (Figura 3.1 B). Por último, cerca del 30% de las células presentes en el hígado de animales infectados fueron identificadas como Siglec-F⁺ F4/80^{int}, en comparación con un 5% para los no infectados (Figura 3.1 C).

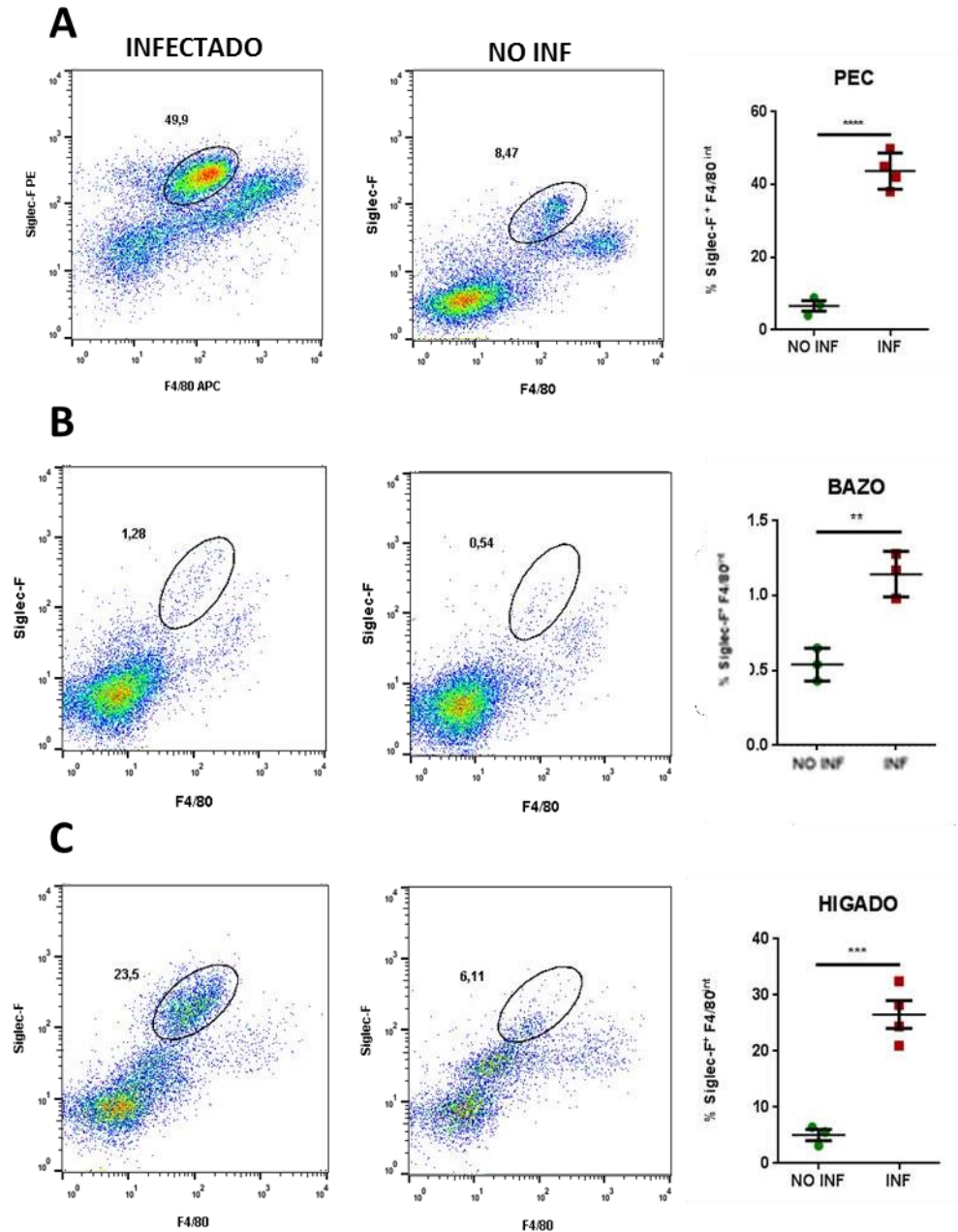


Figura 3.1. Los eosinófilos son reclutados en alta proporción a la cavidad peritoneal y al hígado en animales infectados por *F. hepatica*. Células de la cavidad peritoneal (A), esplenocitos (B) y leucocitos hepáticos (C) fueron obtenidos de ratones infectados por *F. hepatica* 21 días post infección (21 dpi) y no infectados, marcados con anticuerpos anti Siglec-F y F4/80 y analizados por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de eosinófilos (definidos como Siglec-F+ F4/80^{int}). Se aplicó el t-test de dos colas. ****, P<0,0001; ***, P<0,001; **, P<0,01; *, P<0,05.

Posteriormente, verificamos la identidad de las células Siglec-F⁺ F4/80^{int} de PEC e hígado por microscopía, purificando esta población celular mediante sorting y realizando una tinción de May-Grunwald Giemsa. Las células mostraron características morfológicas que se corresponden con eosinófilos murinos, como el núcleo en forma de anillo, medio anillo o multi-lobulado, acompañado de un citoplasma teñido de fucsia intenso (Figura 3.2). Es importante notar que la visualización de los gránulos de los eosinófilos murinos es más difícil que en el caso de los eosinófilos humanos (Figura 1.5).

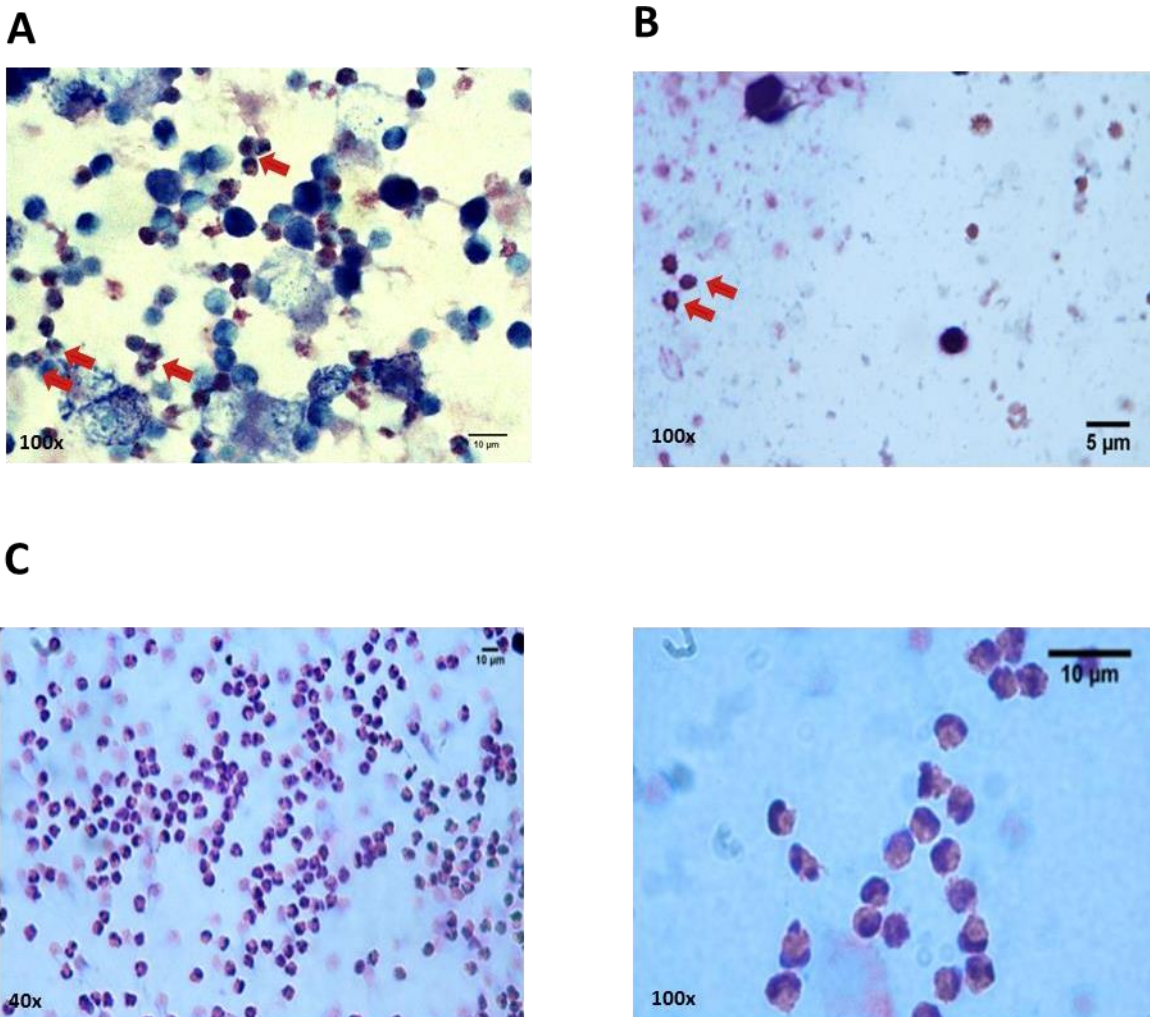


Figura 3.2. Las células Siglec-F⁺ F4/80^{int} de la cavidad peritoneal e hígado de animales infectados por *F. hepatica* poseen características morfológicas de lo eosinófilos. Células de la cavidad peritoneal (A) y leucocitos hepáticos (B) de animales infectados por *F. hepatica* fueron obtenidos a 21 dpi, dispuestos en láminas, teñidos con tinción de May Grunwald Giemsa, y observados al microscopio. C) Eosinófilos sorteados a partir de células de la cavidad peritoneal de animales infectados con *F. hepatica*, teñidos con tinción May Grunwald Giemsa. Las flechas rojas indican los eosinófilos.

Estos datos indican que existe un reclutamiento de eosinófilos en la cavidad peritoneal e hígado principalmente de animales infectados por *F. hepatica* y que su identificación como células Siglec-F⁺ F4/80^{int} es adecuada.

El transcurso de la infección por *F. hepatica* se corresponde con un aumento en el daño hepático

Con el fin de obtener una medida de la gravedad de la infección por *F. hepatica* en nuestro modelo experimental, se calculó un score o puntaje para cuantificar los signos clínicos provocados por la infección parasitaria, según la tabla 2.1 (ver sección materiales y métodos). En la Figura 3.3 A se observa que el score clínico aumenta a medida que transcurre la infección. Además del score clínico, se midió la actividad de la enzima alanina transaminasa (ALT) para determinar el daño hepático inducido por la infección, a diferentes días post-infección (Figura 3.3 B y 3.3 C). La actividad de la enzima alanina transaminasa mostró un aumento significativo a los 21 dpi y en los animales que presentaron un score clínico de 9 o 10, confirmando resultados de nuestro grupo (192) en los que se evidenció aumento en la actividad de esta enzima a los 21 dpi.

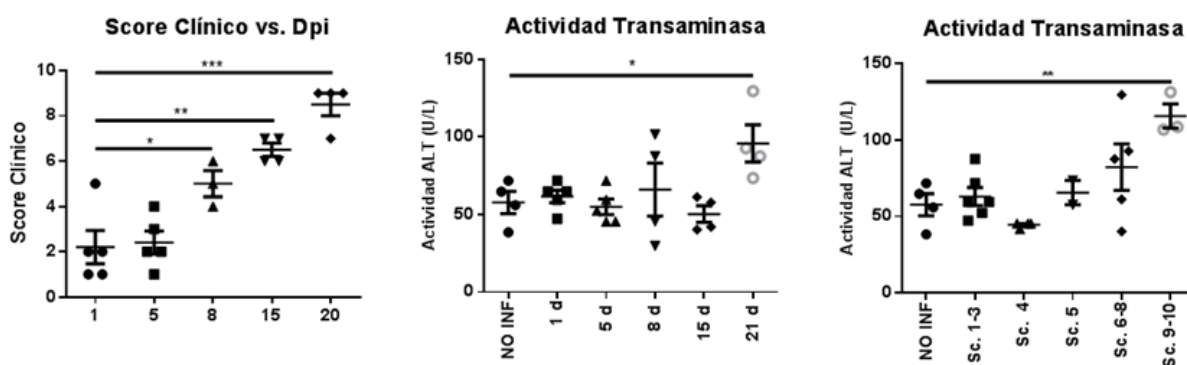
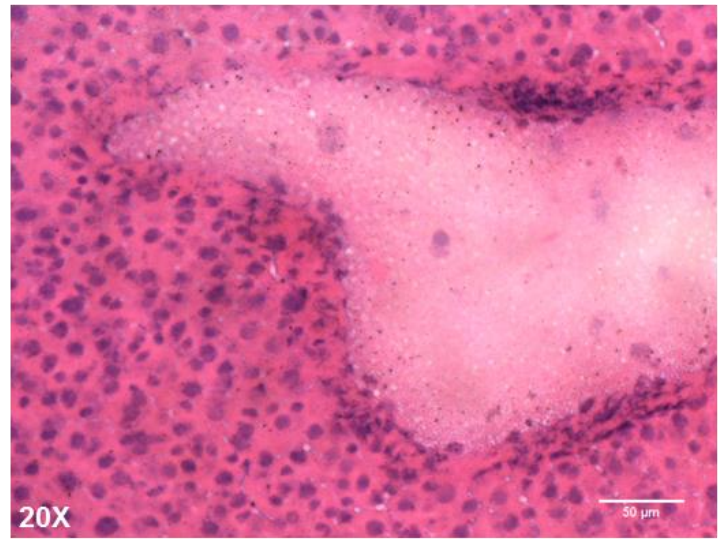
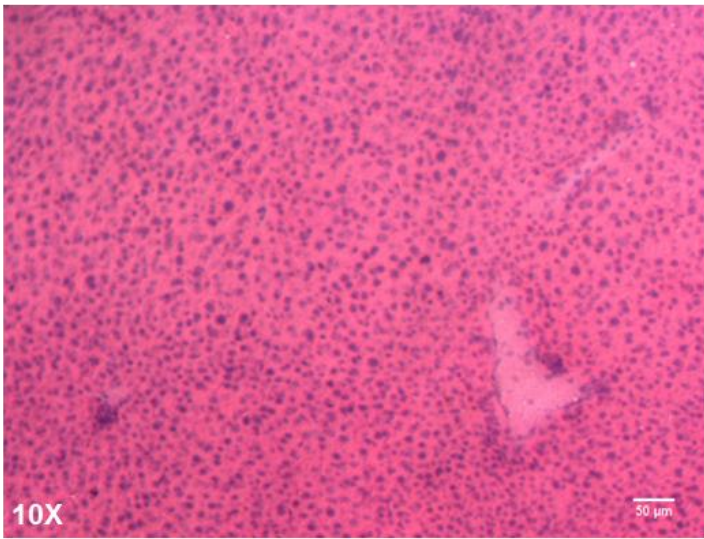


Figura 3.3. La gravedad de la infección por *F. hepatica* se corresponde con un aumento en el daño hepático. A) Score de infección en función de los días post-infección. El score clínico de infección se calculó en base a la tabla 2.1 (ver sección materiales y métodos). **B)** Actividad de la enzima alanina transaminasa en función de los días post-infección, medida en suero de animales infectados y no infectados **C)** Actividad de ALT en función del score de infección, medida en suero de animales infectados y no infectados. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

La presencia de daño hepático también fue determinada mediante tinciones histológicas con Hematoxilina-Eosina. El hígado infectado se caracterizó por una mayor infiltración leucocitaria y zonas necrosadas en comparación con el hígado no infectado. Además, se evidenció la presencia de eosinófilos en los infiltrados leucocitarios de los hígados infectados, ya que son células que presentan núcleo bi- o multi-lobulado y citoplasma fucsia (Figura 3.4).

Estos resultados demuestran que a pesar que la medición de actividad transaminasa en suero es un buen indicador del daño hepático provocado por el parásito, es un parámetro que aparece tardíamente, cuando el hígado posee altos niveles de necrosis y fibrosis, mientras que los signos clínicos aumentan proporcionalmente con el avance de la infección, luego de la primer semana post-infección.

NO INFECTADO



INFECTADO

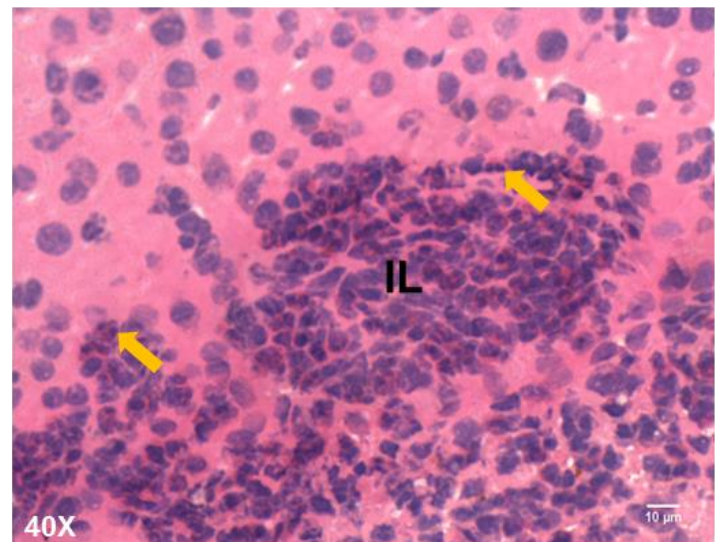
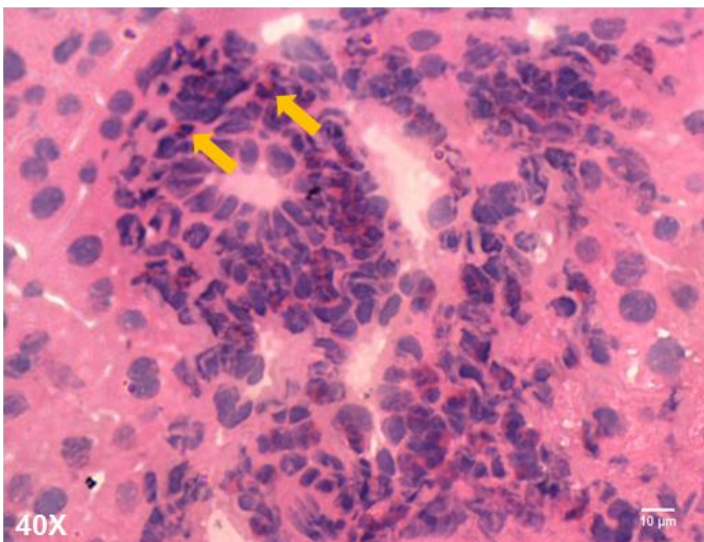
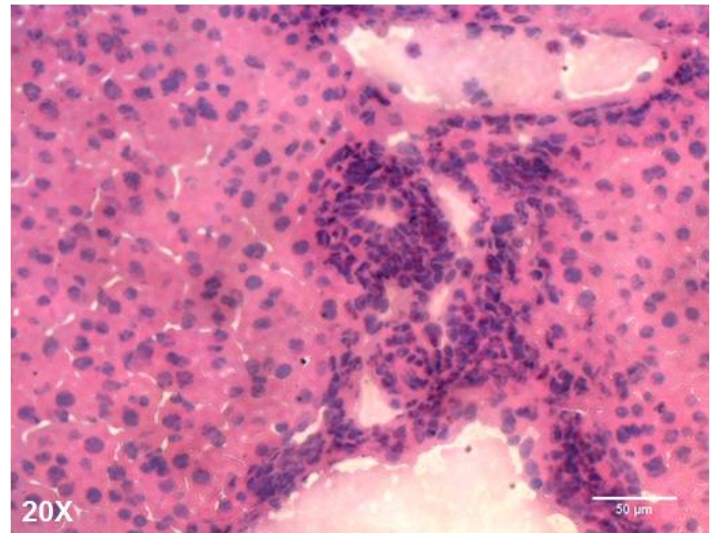
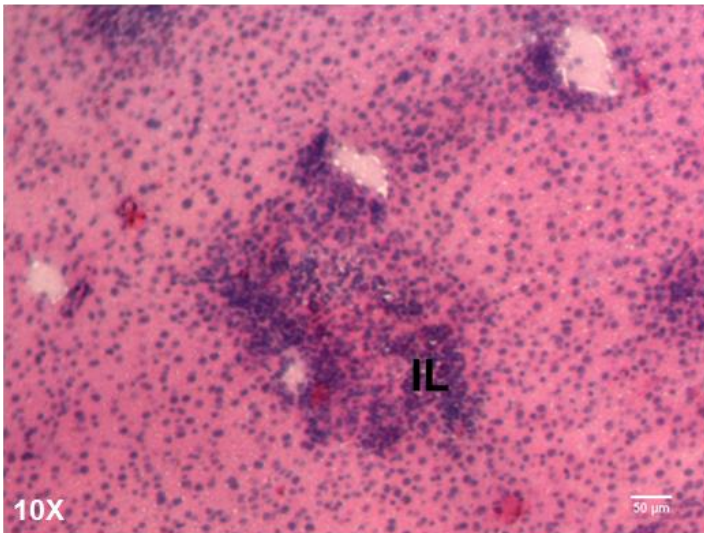


Figura 3.4. La infección por *F. hepatica* induce daño hepático y reclutamiento de eosinófilos hacia el hígado. Cortes de tejido hepático perteneciente a animales infectados de score 5 y no infectados fueron teñidos con tinción de Hematoxilina-Eosina y observados al microscopio óptico. Las flechas amarillas indican eosinófilos. IL: infiltrado leucocitario.

La concentración de CCL11, TSLP e IL-5 en ascitis de animales infectados aumenta con la gravedad de la infección

Con el fin de continuar con la caracterización de la infección por *F. hepatica* en ratones, se buscó cuantificar el nivel de las citoquinas IL-5, CCL11 y TSLP en la ascitis y en suero de animales infectados por su implicancia en el desarrollo y reclutamiento de eosinófilos. Como ya fue mencionado en la introducción, la IL-5 es una citoquina de fundamental importancia tanto para el desarrollo como para el mantenimiento de los eosinófilos (168). Por otra parte, TSLP pertenece a la familia de las citoquinas de tipo IL-2 y es esencial en iniciar y mantener la respuesta de tipo Th2 (169, 170). Por último, CCL11 es una quimioquina que, entre otras funciones, recluta eosinófilos y promueve la acumulación de los mismos en los sitios de infección (171), además de promover la polarización de la respuesta inmune hacia el tipo Th2 (172).

Como se observa en la Figura 3.5, los niveles de IL-5, CCL11 y TSLP en ascitis aumentaron a medida que aumenta el score de infección. En el caso de IL-5 y TSLP, este aumento se observó de manera más gradual, mientras que para CCL11, solamente los animales con un score alto (6-10) presentaron altos niveles con respecto al control (Figura 3.5 A). Por otro lado, la concentración de estas citoquinas en suero resultó ser variable, y no se detectó un aumento de las mismas con el transcurso de la infección. Sin embargo, evidenciamos una disminución de CCL11 y TSLP en suero en etapas tardías de la infección (Figura 3.5 B).

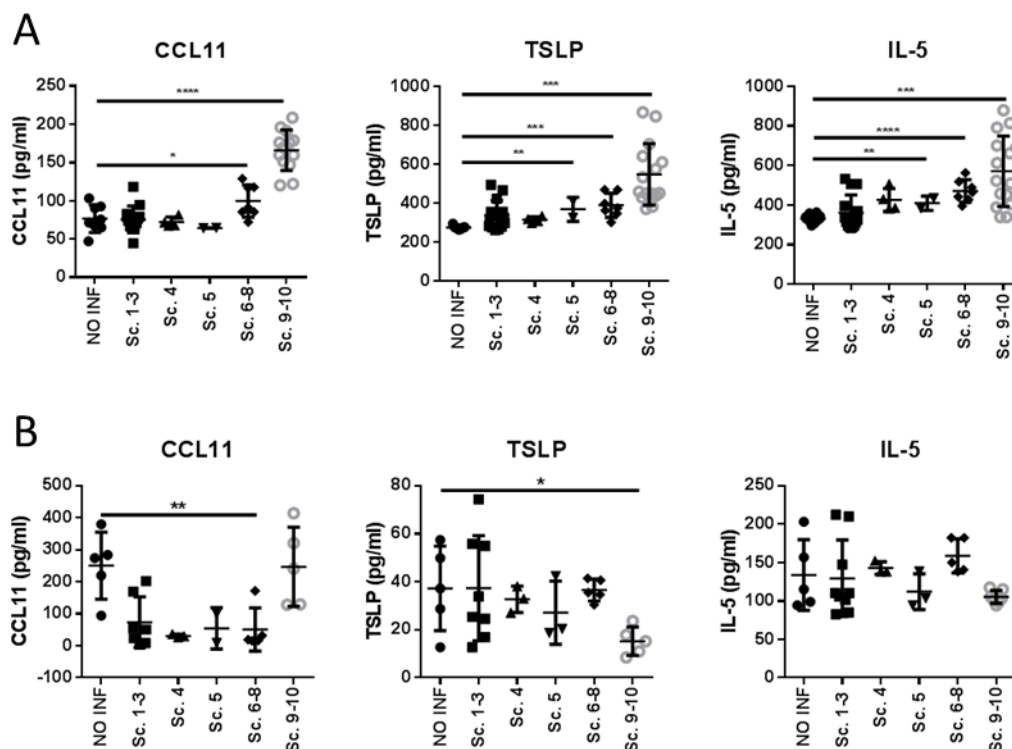


Figura 3.5. Cuantificación de citoquinas TSLP e IL-5 y quimioquina CCL11 en ascitis y suero de animales infectados y no infectados. Animales infectados con *F. hepatica* y controles no infectados se sangraron, sacrificaron, y posteriormente se recolectó el líquido de la cavidad peritoneal. Posteriormente éste fue centrifugado y el sobrenadante (ascitis) se separó del pellet (células). Los niveles de CCL11, TSLP e IL-5 se cuantificaron por ELISA de tipo sándwich utilizando muestras de ascitis (A) o suero (B) según se explica en Materiales y Métodos. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

El reclutamiento de eosinófilos en hígado y cavidad peritoneal aumenta con la gravedad y el tiempo de infección

Para profundizar en el estudio de la presencia de eosinófilos durante la infección por *F. hepatica* en ratones, analizamos el porcentaje de eosinófilos así como el número absoluto en PEC e hígado durante el transcurso de la infección. Para identificar a los eosinófilos, en primer lugar seleccionamos las células totales, descartando el debris celular. Seguidamente, seleccionamos los singuletes, para luego definir a los eosinófilos como las células Siglec-F⁺. En el caso del PEC, se observó un aumento tanto en el porcentaje como en el número absoluto de eosinófilos a medida que aumenta el score clínico de infección (Figura 3.6 A). En el caso del número absoluto, puede observarse un aumento drástico a partir del score 6, mientras que el aumento en el porcentaje de eosinófilos se da de forma más gradual, registrándose un leve aumento a partir del score 5. En cuanto a la evolución en el tiempo, se observó un aumento en el porcentaje de células Siglec-F⁺ a medida que avanza el tiempo post-infección. Específicamente, se observó un aumento significativo a partir de la primera semana post-infección (Figura 3.6 A).

En el hígado también se observó un aumento en el porcentaje de eosinófilos que se correlacionó con un aumento en el score clínico (Figura 3.6 B). En este caso, se obtuvo una diferencia significativa de porcentaje de eosinófilos con respecto al no infectado a partir del score 9. Por otro lado, también se observó un aumento significativo en el porcentaje de eosinófilos a medida que aumenta el tiempo post-infección, registrándose una diferencia significativa a partir de las dos semanas post-infección (Figura 3.6 B).

En su conjunto, estos resultados indican que la presencia de eosinófilos en la cavidad peritoneal es un evento temprano en la infección experimental en ratones, y que ésta aumenta de forma proporcional, junto con los niveles de IL-5, TSLP e CCL11, con la gravedad de la infección.

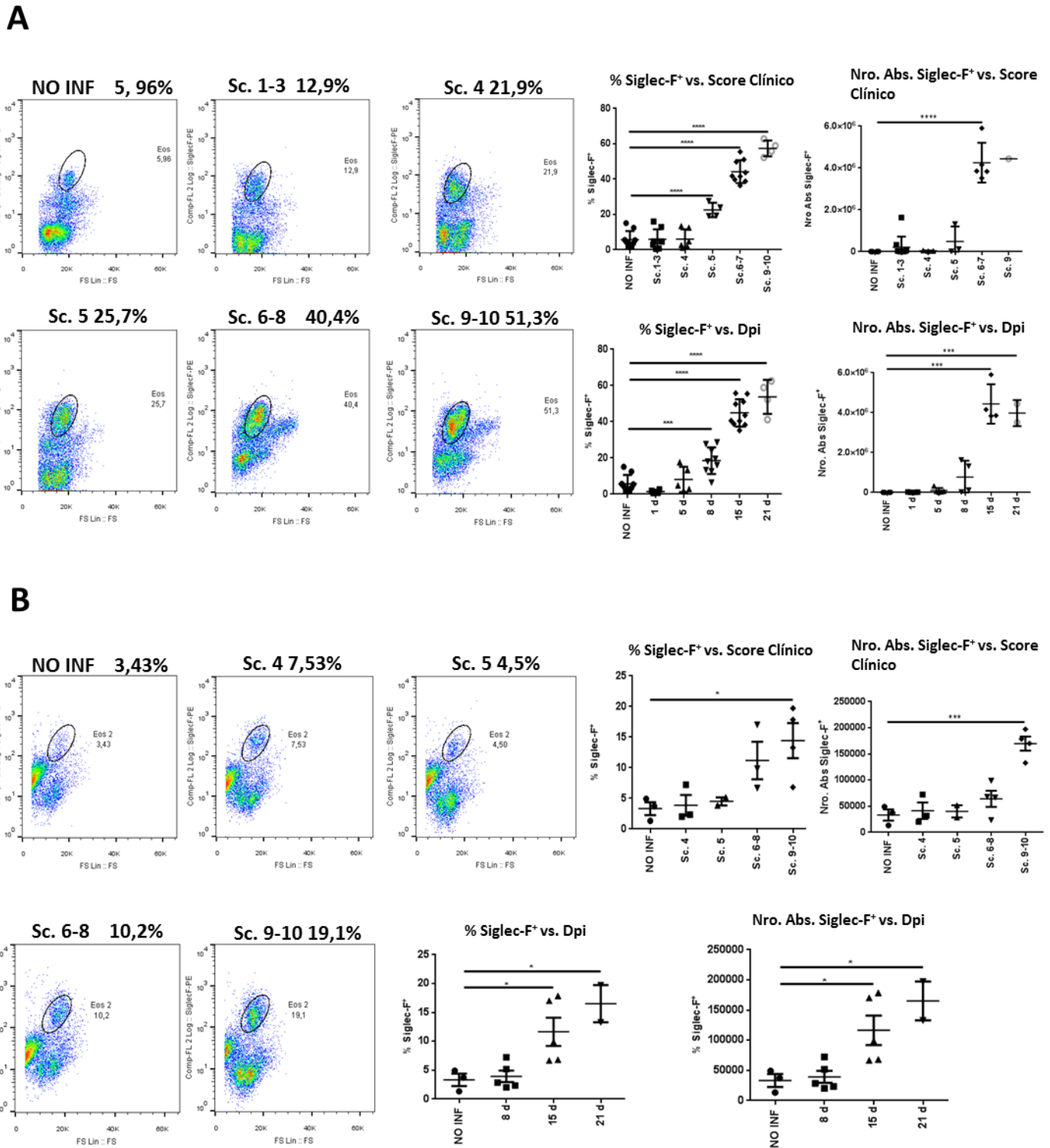


Figura 3.6. El reclutamiento de eosinófilos al hígado y cavidad peritoneal de animales infectados con *F. hepatica* aumenta con el tiempo y la gravedad de la infección. Las células de la cavidad peritoneal (PEC) y los leucocitos hepáticos obtenidos de animales infectados en diferentes etapas de la infección experimental fueron obtenidos con un anticuerpo anti- Siglec-F. Posteriormente, las células fueron analizadas por citometría de flujo. Se definieron a los eosinófilos como las células Siglec-F⁺ **A)** Reclutamiento de eosinófilos hacia la cavidad peritoneal en animales no infectados e infectados con diferente score y tiempo de infección. Se muestra el porcentaje de células Siglec-F⁺ así como el número absoluto de células Siglec-F⁺. **B)** Reclutamiento de eosinófilos hacia el hígado de animales no infectados e infectados con diferente score y tiempo de infección. Se muestra el porcentaje de células Siglec-F⁺. FS Lin (Forward Side en escala lineal) Se aplicó el t-test de dos colas. ****, P<0,0001; ***, P<0,001; **, P<0,01; *, P<0,05.

Los eosinófilos de animales infectados expresan moléculas características de los granulocitos

Para caracterizar a los eosinófilos que son reclutados tanto a la cavidad peritoneal como al hígado de animales infectados, las células provenientes de hígados y PEC de animales de 21 dpi se marcaron con anticuerpos específicos para diferentes moléculas, analizándose la expresión de las mismas en eosinófilos por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 3.7, tanto los eosinófilos de PEC como hígado expresaron altos niveles de Siglec-F, CD11b, Ly6G, Sirp- α , CCR3 y F4/80, CD44 y CD162 (Figura 3.7), mientras que expresaron bajos niveles (o no expresaron) de CD11c, CD80, CD40, MHCII, CD64, CD4 y CD8 (Figura 3.8).

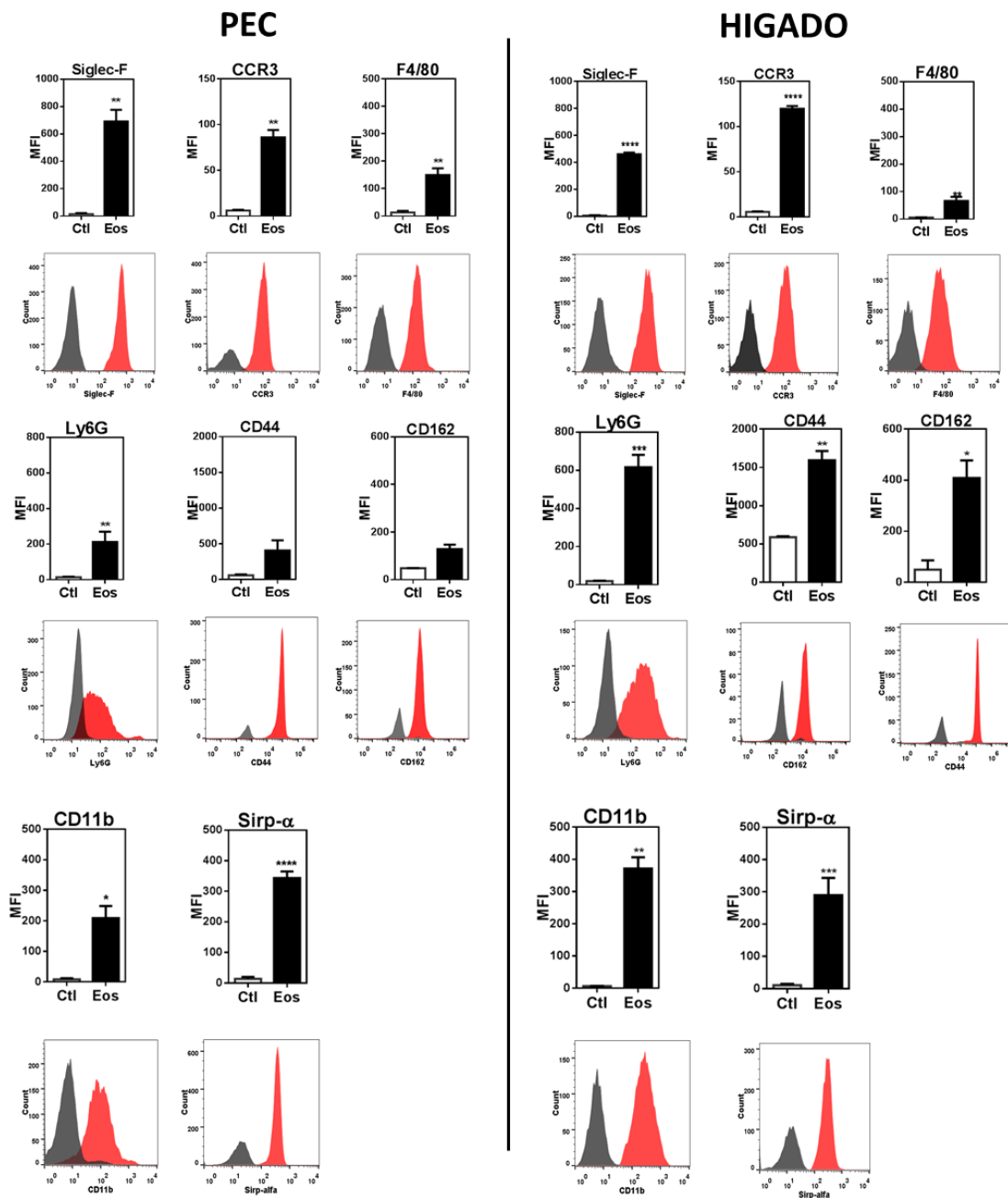


Figura 3.7. Estudio del fenotipo de eosinófilos peritoneales y hepáticos. Se obtuvieron células de la cavidad peritoneal y leucocitos hepáticos de animales infectados con *F. hepatica* a 21 dpi y se marcaron con anticuerpos específicos para una gran variedad de moléculas. Se analizó la expresión de las mismas mediante citometría de flujo en los eosinófilos. (Ver definición de eosinófilos y control en anexo). El MFI para cada molécula resulta de un promedio del MFI de 4 animales individuales. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, P<0,0001; ***, P<0,001; **, P<0,01; *, P<0,05.

Se observaron además algunas diferencias en la expresión de algunas moléculas entre los eosinófilos proveniente de hígado y de la cavidad peritoneal de animales infectados. En efecto, mientras que los eosinófilos peritoneales presentaron mayores niveles de Siglec-F y F4/80 que los de hígado, los eosinófilos hepáticos presentaron mayor expresión de CCR3 (el receptor de CCL11), CD11b, Ly6G, CD44 y CD162. Por último, la molécula Sirp- α , cuya expresión está asociada a una mayor sobrevivencia del eosinófilo (73), se expresó en niveles similares por ambos tipos de eosinófilos (Figura 3.7).

Las diferencias observadas entre los eosinófilos provenientes de hígado y de la cavidad peritoneal podrían corresponder a diferente grado de diferenciación o estar asociadas a su función, como se discutirá más adelante en la discusión.

La expresión de algunos de estos marcadores fue comprobada también por inmunofluorescencia, en PEC y leucocitos hepáticos de animales infectados a 21 dpi y no infectados (Figuras 3.9 y 3.10). Específicamente, la expresión de Siglec-F y CCR3 en eosinófilos del líquido de la cavidad peritoneal e hígado fue confirmada por microscopía (Figuras 3.9 y 3.10). Además, se identificaron eosinófilos de la cavidad peritoneal que expresan las moléculas CD162, CD44 y CCR2 (Figura 3.9). Estas moléculas se expresan en eosinófilos migratorios y con mayor estado de activación (173). En las microscopías correspondientes al PEC de animales

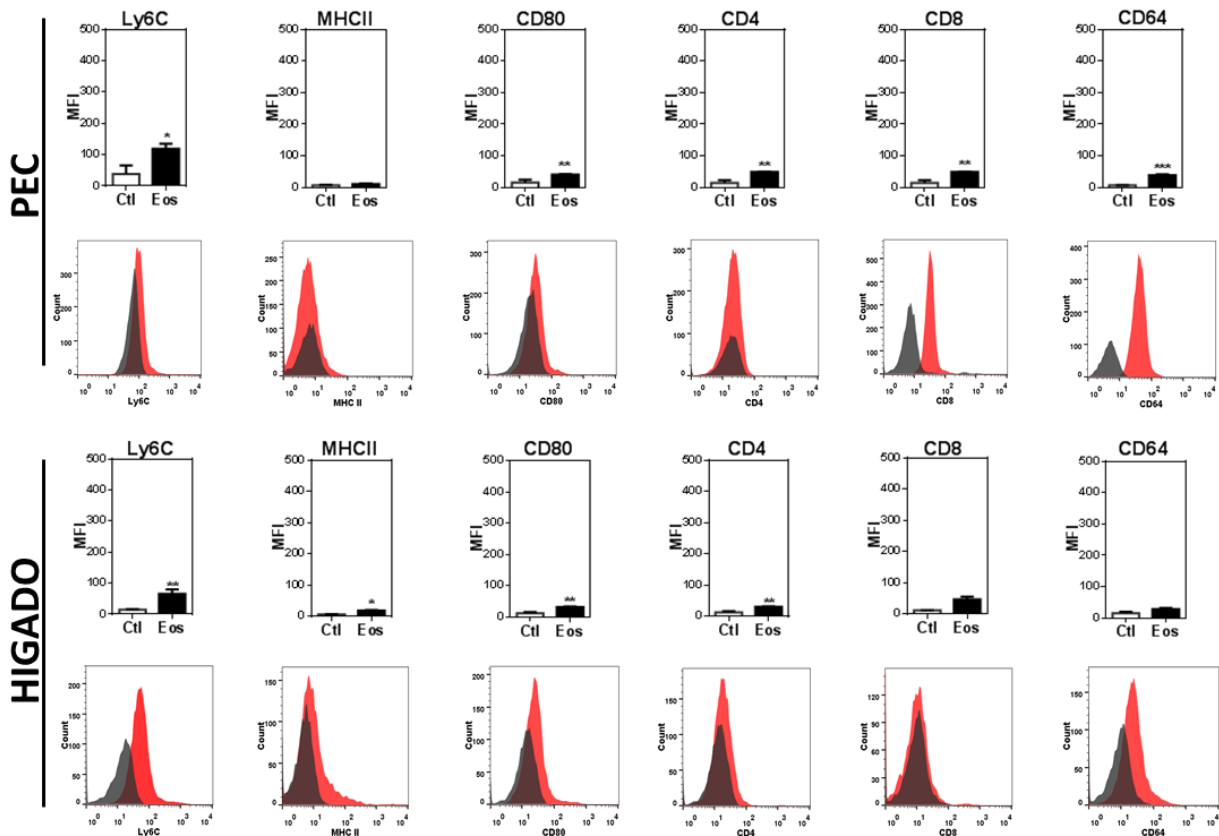


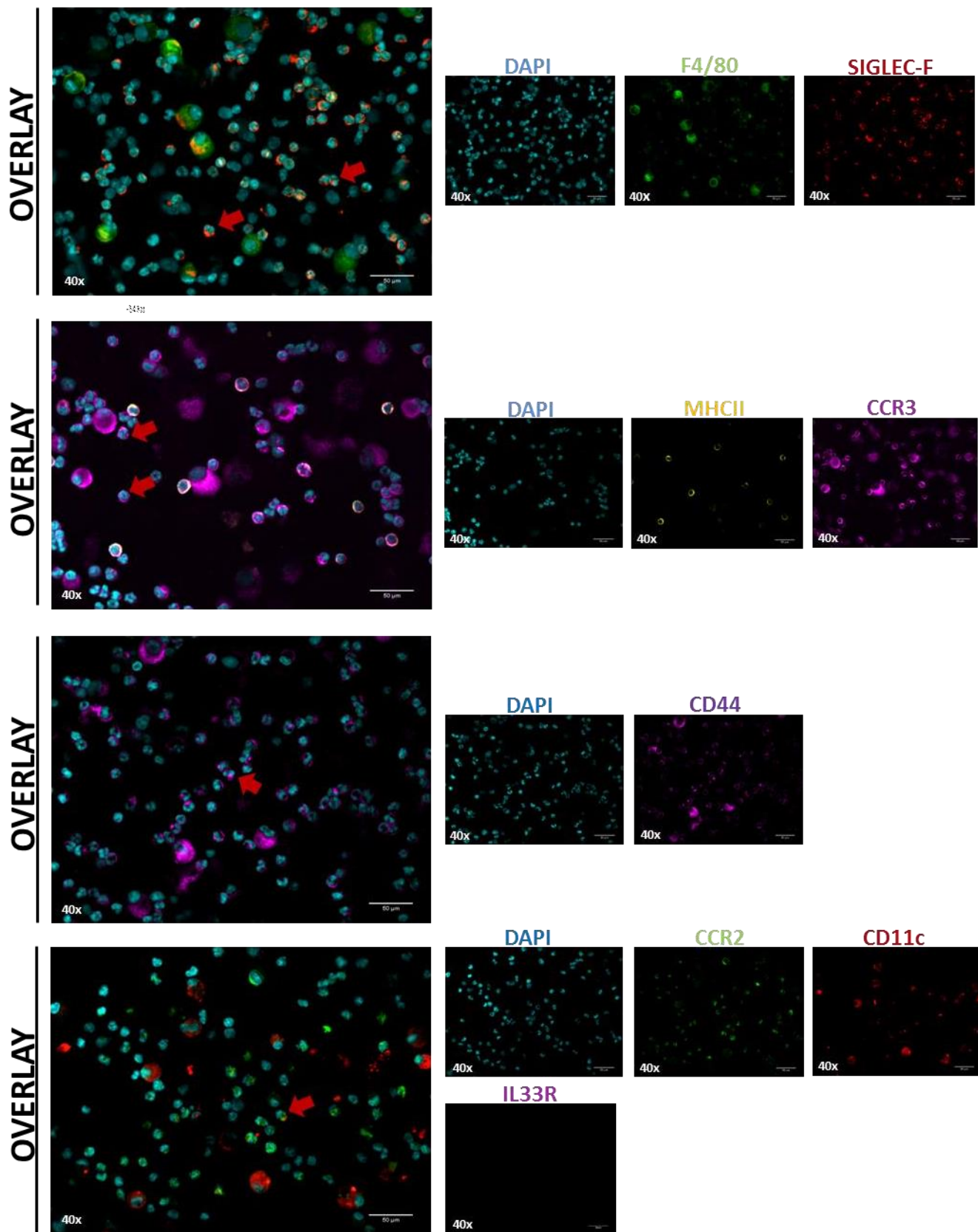
Figura 3.8. Marcadores levemente o no expresados en eosinófilos. Se obtuvieron células de la cavidad peritoneal y leucocitos hepáticos de animales infectados con *F. hepatica* a 21 dpi y se marcaron con anticuerpos específicos para una variedad de moléculas. Se analizó la expresión de las mismas mediante citometría de flujo en eosinófilos (ver definición de eosinófilos y control en anexo). El MFI para cada molécula resulta de un promedio del MFI de 4 animales individuales. El control son las células negativas para los marcadores Siglec-F y F4/80. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

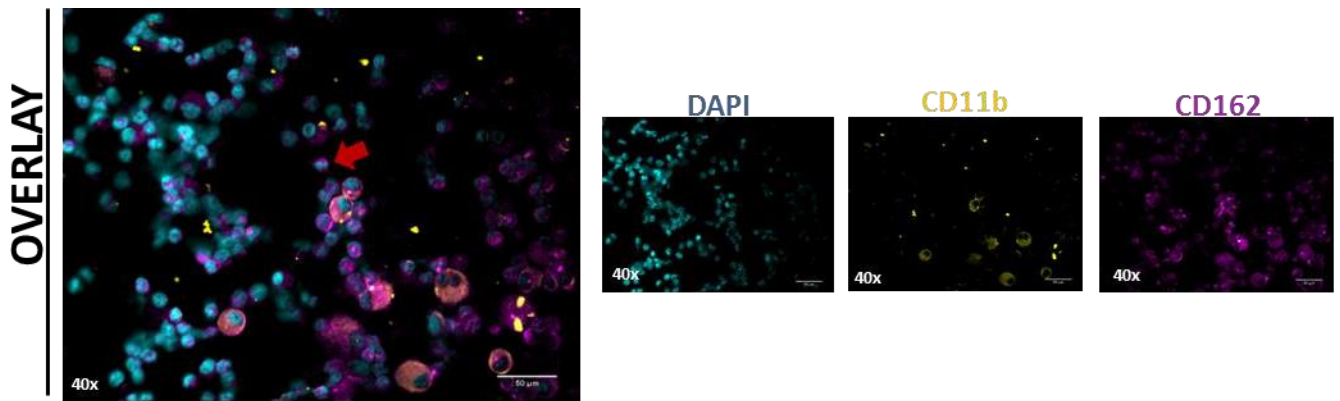
infectados, se observa, además de los eosinófilos, células con núcleo redondeado de mayor tamaño, que expresan F4/80, MHCII, CCR3, CD44, CD11c y CD162, las cuales podrían corresponderse con macrófagos o células dendríticas, que se han identificado previamente en el PEC de animales infectados por *F. hepatica* mediante citometría de flujo por nuestro grupo (174). También es importante notar la diferencia que observamos entre el PEC de animales infectados y el de no infectados. En primer lugar, se visualizó un menor número de células en la cavidad peritoneal de animales control en comparación con los animales infectados, dentro de las cuales se observó menor número de células Siglec-F⁺, así como F4/80⁺ y MHCII⁺. Por el contrario, la mayoría de las células en el PEC de animales no infectados expresa CCR3, al igual que en los no infectados (Figura 3.9).

La expresión de algunos marcadores en eosinófilos peritoneales sorteados también fue verificada por microscopía (Figura 3.11). Particularmente, se verificó la expresión de Siglec-F, F4/80, CCR3, Ly6G, CCR2, CD162 y CD11b.

En conclusión, estos resultados indican que los eosinófilos expresan altos niveles de moléculas características de granulocitos activados, y que dichos niveles varían en eosinófilos peritoneales y hepáticos, lo cual podría corresponderse con diferente estado de activación o migración.

A – Células de la cavidad peritoneal – Animales infectados





B – Células de la cavidad peritoneal – No Infectados

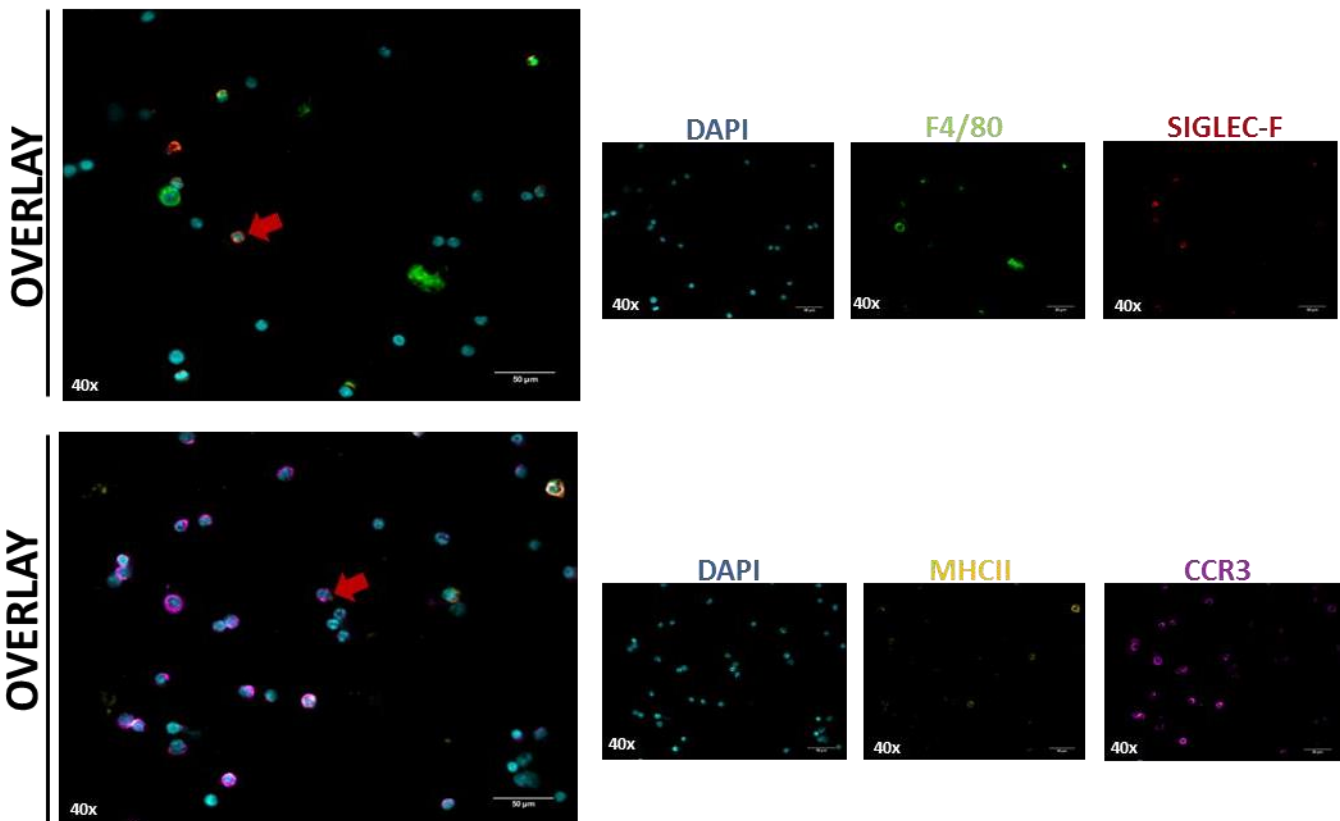


Figura 3.9. Expresión de marcadores en células de la cavidad peritoneal de animales infectados y no infectados. Se obtuvieron células de la cavidad peritoneal de animales infectados y no infectados, se marcaron con anticuerpos específicos para diferentes moléculas y se analizaron en microscopio confocal. **A)** Se muestran imágenes de inmunofluorescencia donde se observa la expresión de Siglec-F, F4/80, MHCII, CCR3, CCR2, CD11c, IL33R, CD11b y CD162 en células de la cavidad peritoneal (PEC) de animales infectados. **B)** Se muestran imágenes de inmunofluorescencia para la expresión de Siglec-F, F4/80, MHCII y CCR3 en PEC de animales no infectados. En todos los casos, la escala corresponde a 50 µm. Las flechas rojas indican eosinófilos.

Leucocitos Hepáticos - Infectados

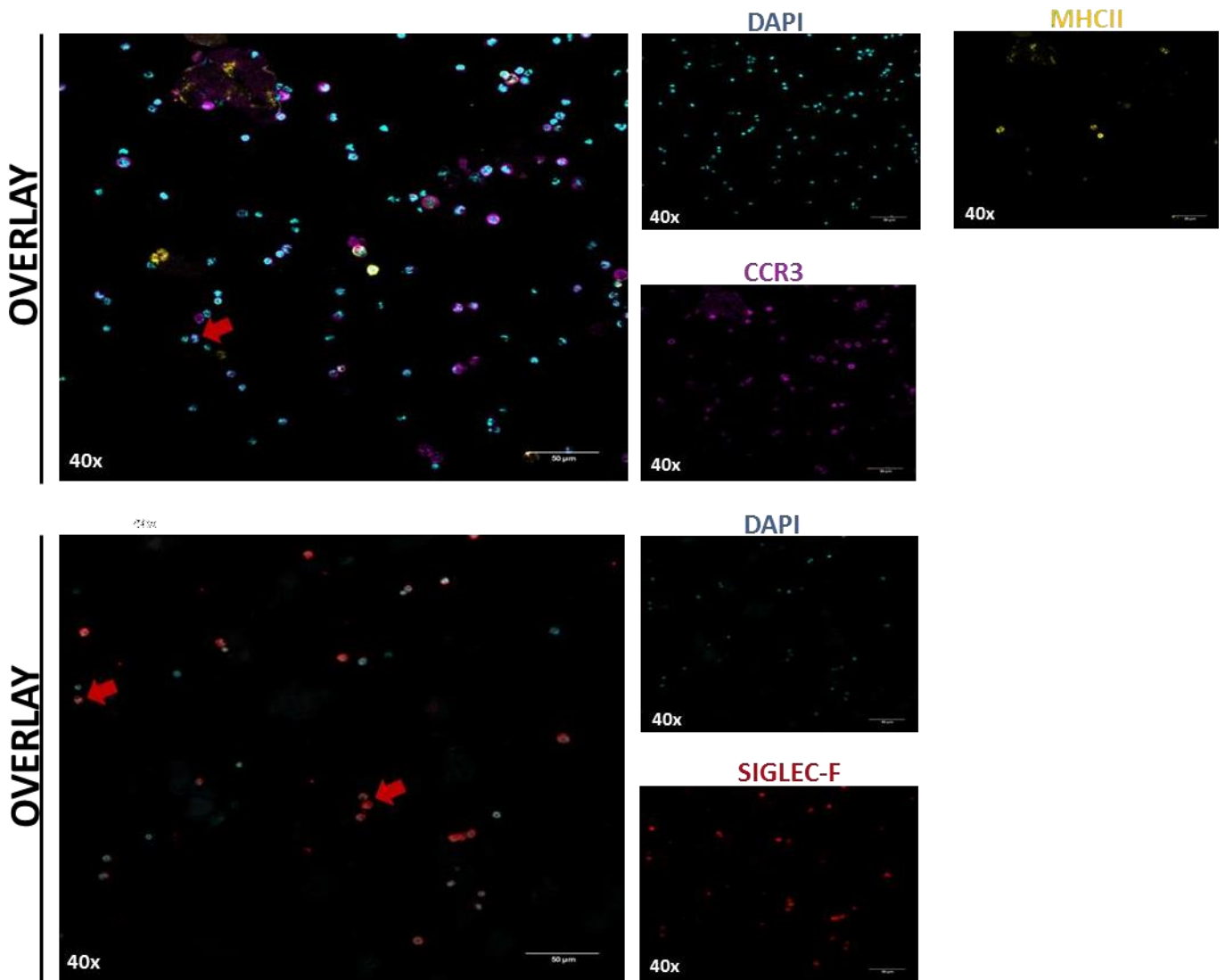


Figura 3.10. Expresión de marcadores en leucocitos hepáticos de animales infectados. Se purificaron leucocitos hepáticos de animales infectados a 21 dpi, se marcaron con anticuerpos específicos para las moléculas Siglec-F, MHCII y CCR3 y se analizaron en microscopio confocal. La escala corresponde a 50 µm. Las flechas rojas indican eosinófilos.

Eosinófilos Sorteados

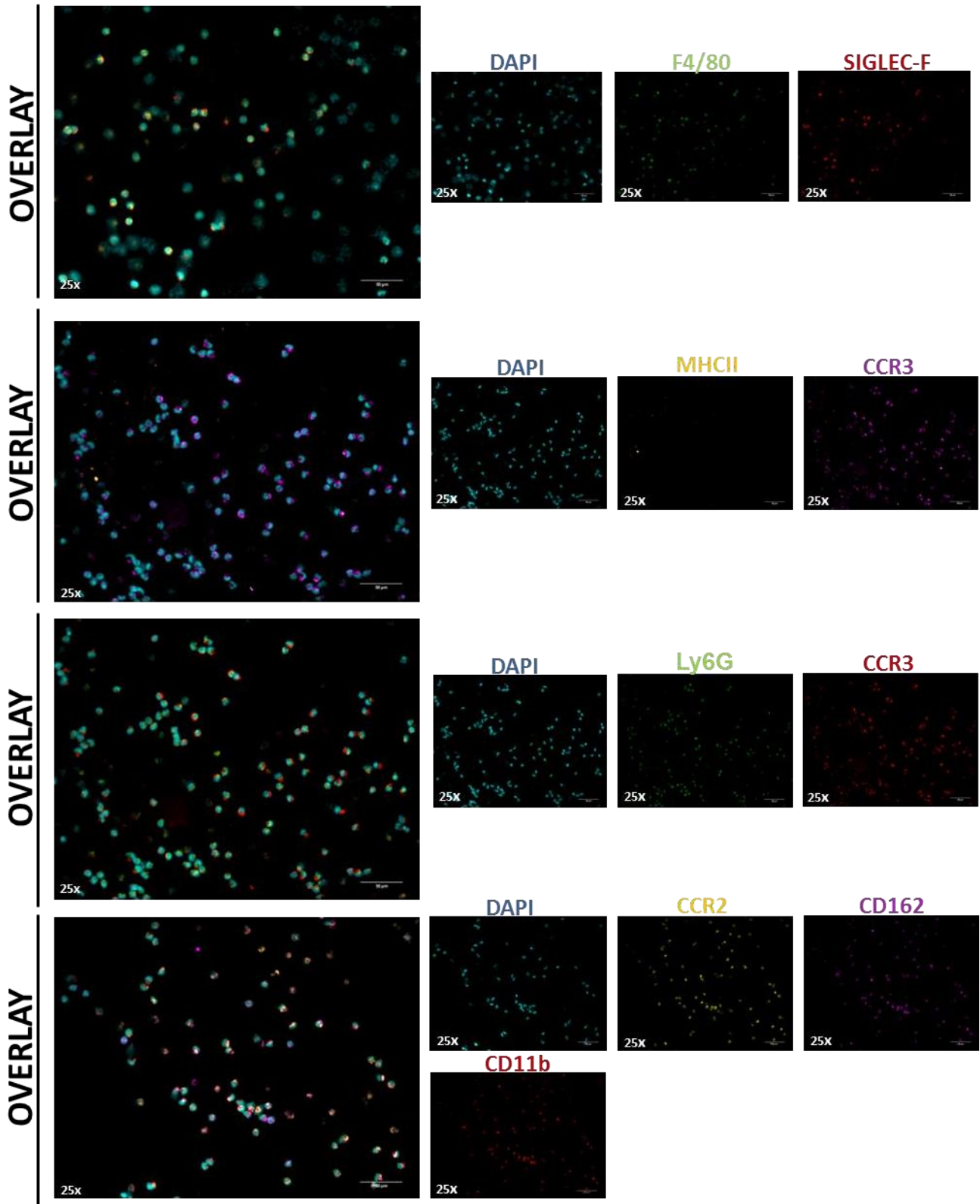


Figura 3.11. Expresión de marcadores en eosinófilos sorteados de la cavidad peritoneal de animales infectados. La expresión de algunos de los marcadores identificados por citometría de flujo fue confirmada por inmunofluorescencia. Los eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados fueron purificados mediante sorting seleccionando las células Siglec-F⁺ F4/80^{ht}, marcados con anticuerpos específicos para diferentes moléculas y analizados en microscopio confocal. La escala corresponde a 50 μ m.

Los eosinófilos peritoneales de animales infectados poseen una mayor expresión de ROS y RNS en comparación con eosinófilos de animales no infectados

A continuación, evaluamos diferentes mecanismos efectores contra parásitos helmintos que pueden mediar los eosinófilos. Uno de ellos fue determinar la capacidad oxidativa de los eosinófilos de animales infectados. Para ello utilizamos una sonda que fluoresce en presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) y analizamos la fluorescencia de eosinófilos peritoneales y hepáticos por citometría de flujo. Los eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados presentaron mayores niveles de ROS/RNS que los eosinófilos de animales no infectados, tanto a 1 dpi como a los 21 dpi (Figura 3.12), aunque se observó mayores niveles a los 21 dpi. Por el contrario, no se registraron diferencias en la expresión de ROS y RNS en eosinófilos provenientes del hígado, a los 21 dpi.

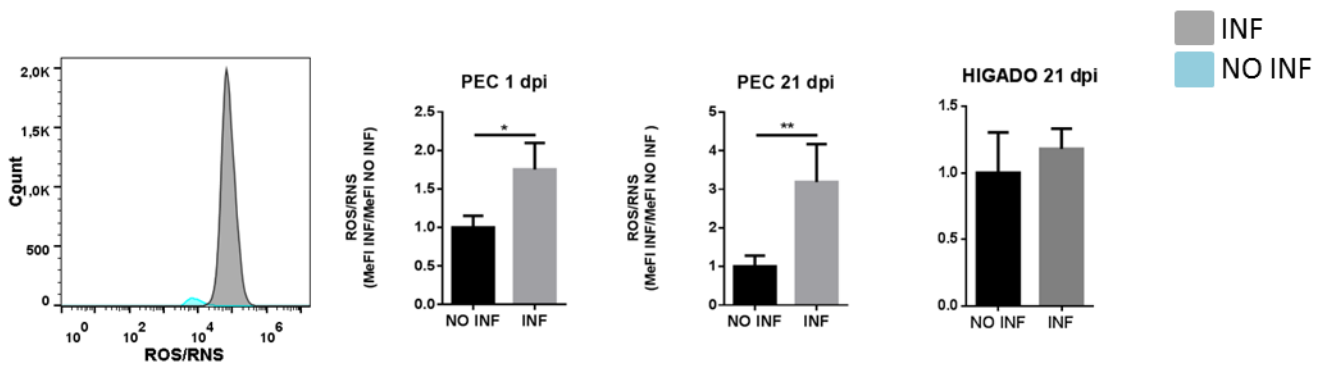


Figura 3.12. Expresión de ROS/RNS en eosinófilos de PEC e hígado de animales infectados y no infectados. Se obtuvieron células de la cavidad peritoneal y leucocitos hepáticos de animales infectados y no infectados a 1 y 21 dpi, se incubaron con una sonda específica de ROS/RNS por 30 min a 37°C y se analizaron por citometría de flujo en células Siglec-F⁺ F4/80^{int}. Se muestra el promedio de 4 animales. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, P<0,0001; ***, P<0,001; **, P<0,01; *, P<0,05.

Los eosinófilos derivados de médula ósea (BM-Eos) degranulan al incubarse con anticuerpos específicos de *F. hepatica*

Otro de los mecanismos efectores de los eosinófilos estudiado fue su capacidad de degranulación para liberar componentes tóxicos que pueden dañar la superficie de parásitos helmintos. Para ello, se obtuvieron eosinófilos derivados de la médula ósea de ratones infectados (BM-Eos), y se cultivaron los mismos con un lisado parasitario (FhTE) en presencia o ausencia de anticuerpos específicos del parásito (provenientes de suero de animales infectados) y control (provenientes de suero de ratones no infectados), según un ensayo previamente publicado (175). En el mismo, se evalúa la actividad de la peroxidasa y mieloperoxidasa liberadas por el eosinófilo con la degranulación utilizando los sustratos OPD y H_2O_2 (175). La Figura 3.13 A muestra la degranulación inducida por FhTE, en ausencia de anticuerpos. La degranulación de los BM-Eos muestra una tendencia hacia el aumento en presencia de FhTE en comparación con el medio, si bien esta diferencia no resultó ser significativa. Posteriormente, analizamos la degranulación en presencia de suero de animales infectados y no infectados.

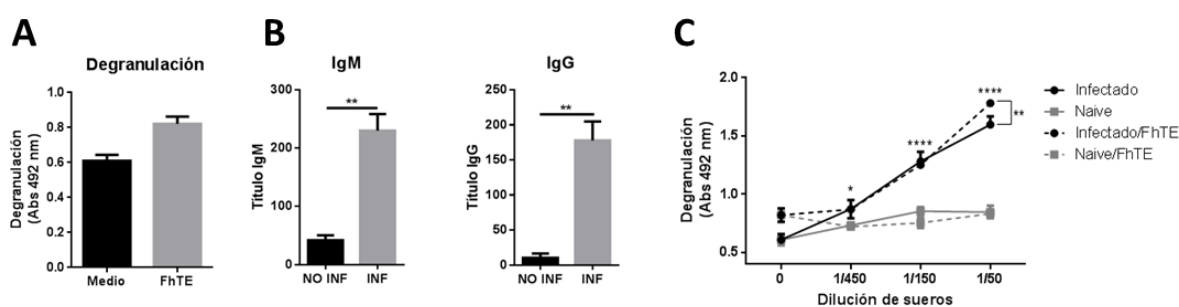


Figura 3.13. Degranulación de eosinófilos en presencia de FhTE y anticuerpos específicos anti *F. hepatica*. Se diferenciaron eosinófilos a partir de células de la médula ósea de ratones infectados por *F. hepatica*, y se cultivaron por 1 hora en presencia de lisado parasitario (FhTE) y diferentes diluciones de sueros de animales infectados y no infectados (Naive). Finalmente, se evaluó la degranulación de los eosinófilos a partir de la medición de la actividad peroxidasa de la mieloperoxidasa y peroxidasa liberadas por el eosinófilo, incubando con una solución que contiene OPD, buffer Tris pH 8 y peróxido de hidrógeno, y midiendo la absorbancia a 492 nm. **A)** Degranulación de eosinófilos derivados de la médula ósea incubados con FhTE. **B)** Títulos de anticuerpos específicos IgM e IgG anti *F. hepatica* presentes en un pool de sueros de animales infectados y no infectados. **C)** Degranulación de eosinófilos derivados de la médula ósea al ser incubados con suero proveniente de animales infectados y no infectados (naive) en ausencia o presencia de FhTE. En A y B se aplicó el t-test de dos colas. En C se aplicó el test two-way ANOVA seguido del test de Tukey de comparación múltiple. ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$. Los asteriscos corresponden a la diferencia entre Infected y Naive e Infected/FhTE y Naive/FhTE y para la diferencia Infected e Infected/FhTE para la dilución de suero 1/50.

En primer lugar, se muestran los títulos de anticuerpos específicos para *F. hepatica* IgM e IgG. Se observa que los animales infectados poseen un mayor título de anticuerpos específicos en comparación con los no infectados (Figura 3.13 B). En cambio, al incubar los BM-Eos con suero conteniendo anticuerpos específicos de *F. hepatica* (tanto IgM como IgG como se muestra en la Figura 3.12 B), se observó un notorio aumento en la degranulación el cual fue modificada al adicionarle el lisado parasitario (FhTE) solamente para la dilución más concentrada de suero (Figura 3.13 C). Además, la degranulación aumentó a medida que aumenta la concentración de suero utilizado.

En su conjunto, estos resultados indican que los eosinófilos de animales infectados poseen la capacidad de efectuar degranulación y de producir especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, ambos mecanismos efectores que pueden dañar a *F. hepatica*.

Los animales infectados por *F. hepatica* presentan una respuesta T CD4 específica polarizada hacia Th2 y Treg

A continuación, analizamos el tipo de respuesta T inducida durante la infección experimental por *F. hepatica*. Para ello, obtuvimos esplenocitos de animales infectados y control, los cultivamos con moléculas parasitarias (FhTE) y analizamos el nivel de citoquinas producidas por ELISA sándwich (IL-4, IL-5 e IL-10). Se observó que los esplenocitos de animales infectados producen mayor cantidad de IL-4, IL-5 e IL-10 al ser estimulados con FhTE, en comparación con los animales no infectados, indicando la inducción de una respuesta T específica de tipo Th2/Treg (Figura 3.14 A).

Este estudio fue complementado por el análisis de los linfocitos T por citometría de flujo. Con dicho fin, se obtuvieron suspensiones celulares de bazo e hígado así como células del PEC y se analizó el porcentaje de linfocitos T, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y de linfocitos T reguladores. Como se observa en la Figura 3.14 B, la proporción de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ disminuyó significativamente en los animales infectados en comparación con los no infectados, a excepción del bazo, donde no se registraron diferencias significativas para los linfocitos T CD8⁺. También se evaluó el porcentaje de linfocitos T CD25⁺ Foxp3⁺ dentro de los CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD4⁻ (cuya mayoría son CD8⁺). Se observó un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ en bazo, hígado y PEC de animales infectados en comparación con los no infectados. De igual forma, puede observarse un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ CD4⁻ CD25⁺ Foxp3⁺, si bien la diferencia no resultó significativa a excepción del PEC (Figura 3.14 B).

En conjunto, estos resultados indican que durante la infección por *F. hepatica* se genera una respuesta polarizada hacia Th2 y Treg, con una disminución significativa de la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ y aumento de linfocitos T reguladores en todos los órganos evaluados.

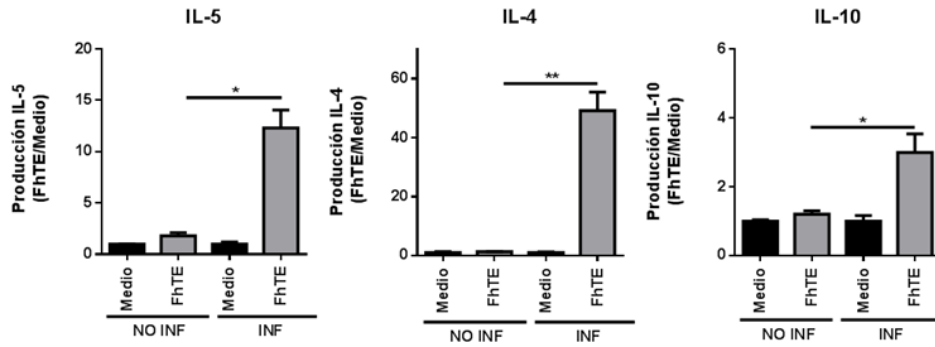
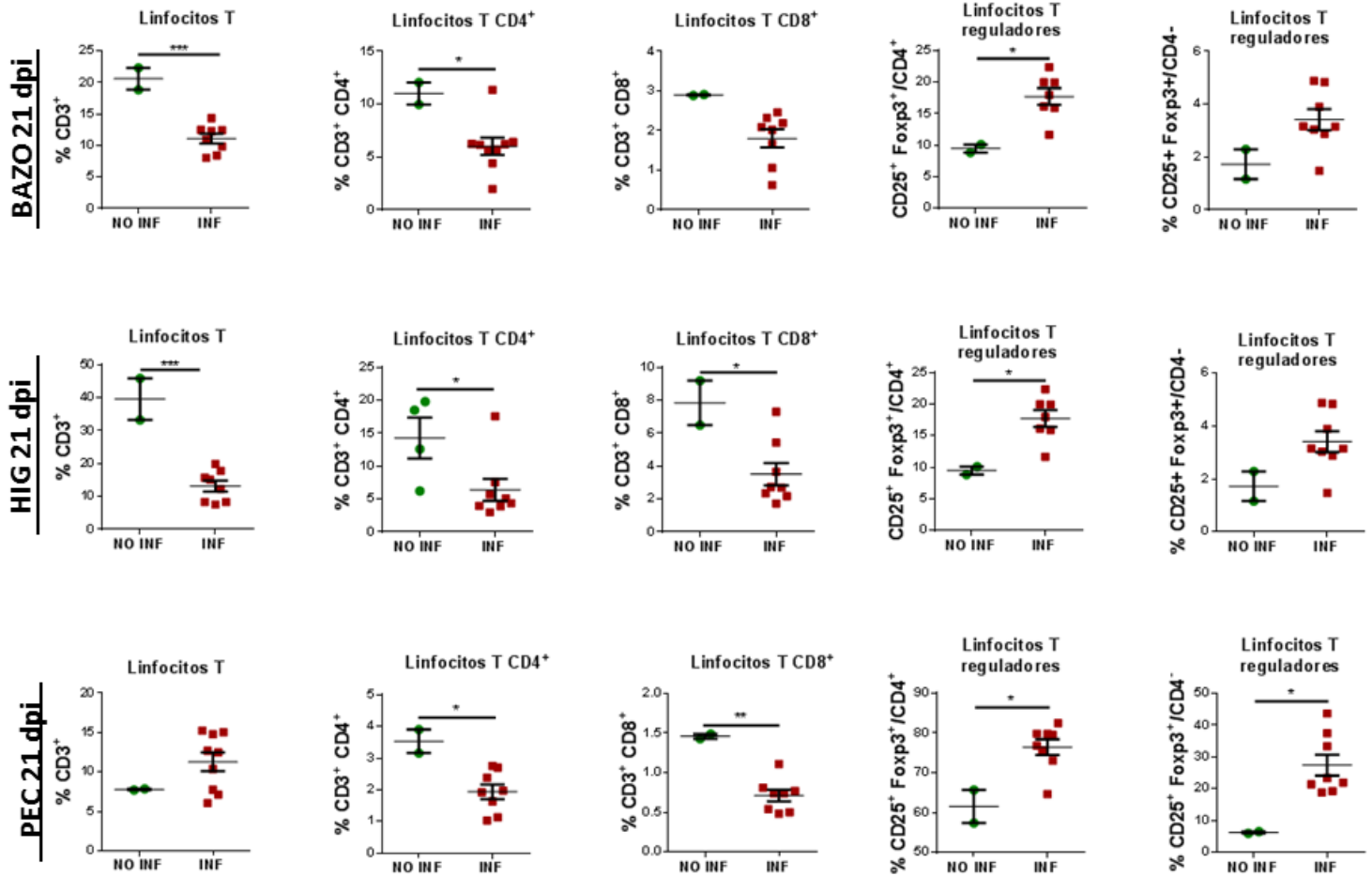
A**B**

Figura 3.14. Caracterización de la respuesta T desarrollada durante la infección por *F. hepatica* en ratones. A) Producción de citoquinas por esplenocitos específicos de *F. hepatica*. Se obtuvieron esplenocitos de animales infectados y no infectados, y se los cultivó con FhTE y medio como control. Posteriormente, se obtuvo el sobrenadante de cultivo y se cuantificaron las citoquinas presentes en el mismo mediante ELISA sándwich. **B)** Presencia de linfocitos T, T CD4, T CD8 y T reguladores durante la infección por *F. hepatica*. Se obtuvieron suspensiones celulares de esplenocitos, leucocitos hepáticos y células de la cavidad peritoneal de animales infectados a 21 dpi y control. Se marcaron dichas células con anticuerpos específicos para CD3, CD4, CD8, CD25 y Foxp3, y se las analizó por citometría de flujo. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

Los eosinófilos provenientes de animales infectados inhiben la proliferación y producción de IFN- γ de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de animales no infectados en condiciones in vitro

Con el fin de investigar si los eosinófilos poseen un rol regulador durante la infección por *F. hepatica*, y considerando el descenso relativo de linfocitos T observado en animales infectados (Figura 3.14), se investigó si los eosinófilos de animales infectados eran capaces de limitar o inhibir la proliferación de los linfocitos T. Para ello, se realizó un ensayo de co-cultivo utilizando eosinófilos purificados de animales infectados y esplenocitos totales o linfocitos T CD4⁺ de animales no infectados. Luego de cultivar las células por 5 días, se evaluó la presencia de IFN- γ en el sobrenadante por ELISA y se analizó la proliferación de los linfocitos T por citometría de flujo (Figura 3.15 A). Para la obtención de eosinófilos de animales infectados, purificamos por dos técnicas diferentes los eosinófilos peritoneales: i) enriquecimiento negativo utilizando un kit de purificación de células CD11c⁺ con *beads* magnéticas y ii) clasificación celular de células Siglec-F⁺ F4/80⁻. Los resultados se muestran en las Figuras 3.15 B y C respectivamente.

Al co-cultivar esplenocitos con 50000 y 150000 eosinófilos, se observó que los mismos inhiben la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, así como la producción de IFN- γ . En el caso del co-cultivo con 15000 eosinófilos, también se evidenció una inhibición de la proliferación, aunque más modesta que utilizando concentraciones mayores (Figura 3.15 B).

Por otro lado, la inhibición en la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ fue confirmada al utilizar eosinófilos purificados mediante sorting y linfocitos T CD4⁺ purificados como se observa en la figura 3.15 C.

Los resultados de este ensayo estarían aportando evidencias de que los eosinófilos podrían poseer un rol regulador en la infección por *F. hepatica*, al tener un efecto inhibitorio sobre la proliferación de linfocitos T.

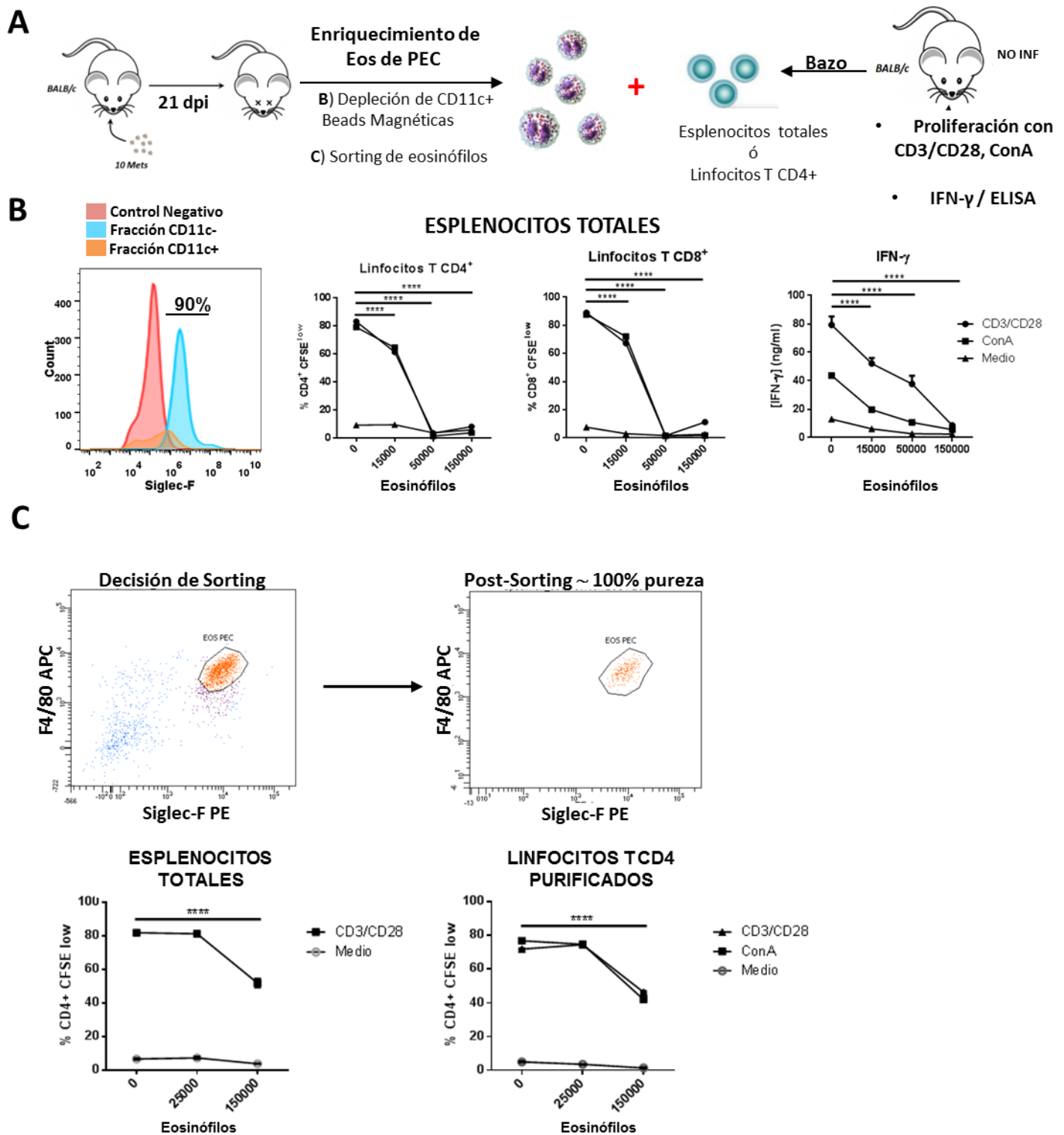
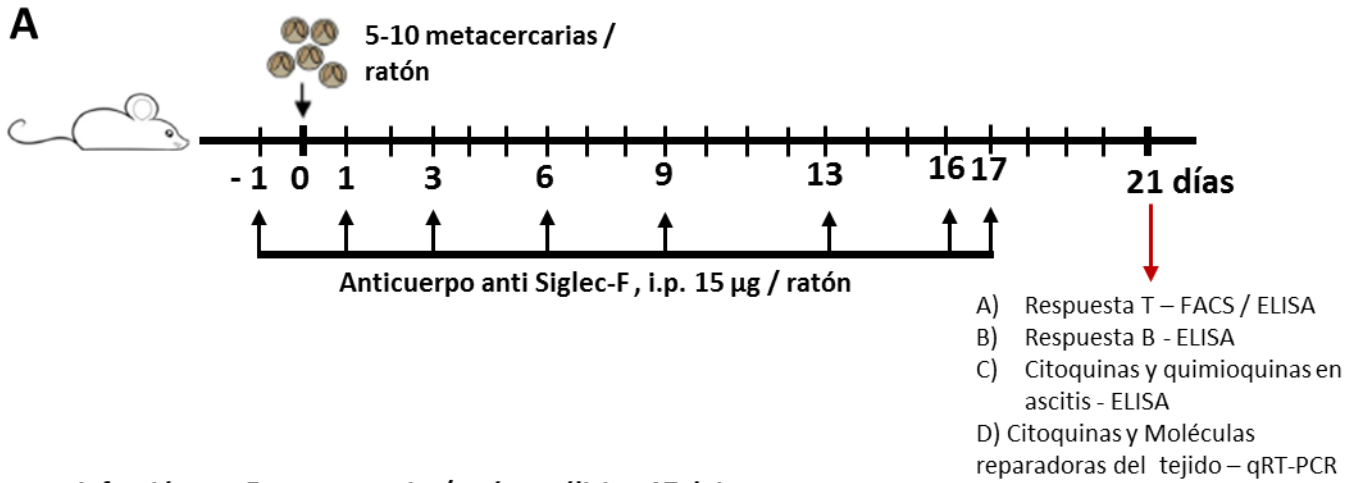


Figura 3.15. Inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ por parte de eosinófilos provenientes de animales infectados por *F. hepatica*. A) Esquema del diseño experimental. Se obtuvieron eosinófilos purificados o una fracción enriquecida de los mismos y se co-cultivaron con esplenocitos totales o linfocitos T CD4⁺ de animales no infectados. Se analizó la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ por citometría de flujo, y la producción de IFN- γ por ELISA sándwich. B) Se muestra un ensayo representativo de la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ utilizando una fracción celular enriquecida en eosinófilos (fracción CD11c⁺). C) Se muestra la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ utilizando esplenocitos totales y eosinófilos purificados mediante sorting. Los esplenocitos fueron estimulados con anticuerpos específicos de CD3/CD28, y los linfocitos T CD4⁺ se estimularon con anti-CD3/CD28 y ConA. Se co-cultivaron estas células con 25.000 y 150.000 eosinófilos, así como en ausencia de los mismos. Se aplicó el test two-way ANOVA seguido del test de Tukey de comparación múltiple. ****, P<0,0001; ***, P<0,001; **, P<0,01; *, P<0,05.

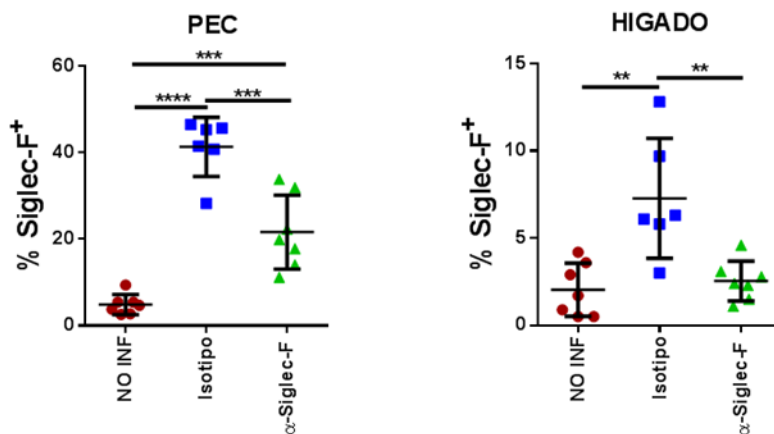
Los eosinófilos limitan el daño hepático inducido durante la infección por *F. hepatica*

Habiendo caracterizado la presencia de eosinófilos durante la infección experimental por *F. hepatica*, así como sus características morfológicas, fenotípicas y alguno de sus mecanismos efectores, a continuación nos preguntamos cual es la función de estos eosinófilos durante la infección parasitaria. Para poder contestar esta pregunta realizamos un ensayo de infección en conjunto con la depleción de los eosinófilos a través de la administración de un anticuerpo α -Siglec-F (mismo clon utilizado para los análisis por citometría de flujo). El grupo control consistió en animales infectados administrados con un anticuerpo α -peroxidasa de rábano como control. Posteriormente, realizamos diferentes experimentos para determinar: i) daño hepático, ii) respuesta celular T, iii) respuesta de anticuerpos y iv) análisis de citoquinas relevantes para el eosinófilo (Figura 3.16 A).

Realizamos dos experimentos de depleción que difirieron ligeramente en las condiciones de infección y de análisis para buscar las condiciones óptimas de depleción: i) infección con 5 metacercarias/ratón y análisis a 17 dpi, (Figura 3.16 B) y ii) infección con 10 metacercarias/ratón y análisis a 21 dpi (Figura 3.16 C). La depleción fue confirmada a través de la identificación de células Siglec-F⁺ en ambos grupos de animales infectados, así como en ratones control (no infectados). En ambos experimentos se encontró una depleción total de células Siglec-F⁺ en hígado (Figura 3.16 B y C), mientras que se observó una depleción parcial en la cavidad peritoneal para el caso de los animales sacrificados a 17 dpi (Figura 3.16 B) y no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de células Siglec-F⁺ peritoneales cuando los animales fueron sacrificados a 21 dpi (Figuras 3.16 C). Esto podría explicarse por el hecho de que en el primer caso, el análisis se efectuó sólo un día luego de la última inyección del anticuerpo α -Siglec-F, mientras que en el segundo caso se realizó 5 días después de la última inyección, lo que podría haber permitido una diferenciación *de novo* de eosinófilos luego de la depleción post-inyección del anticuerpo.



B Infección con 5 metacercarias/ratón, análisis a 17 dpi



Infección con 10 metacercarias/ratón, análisis a 21 dpi

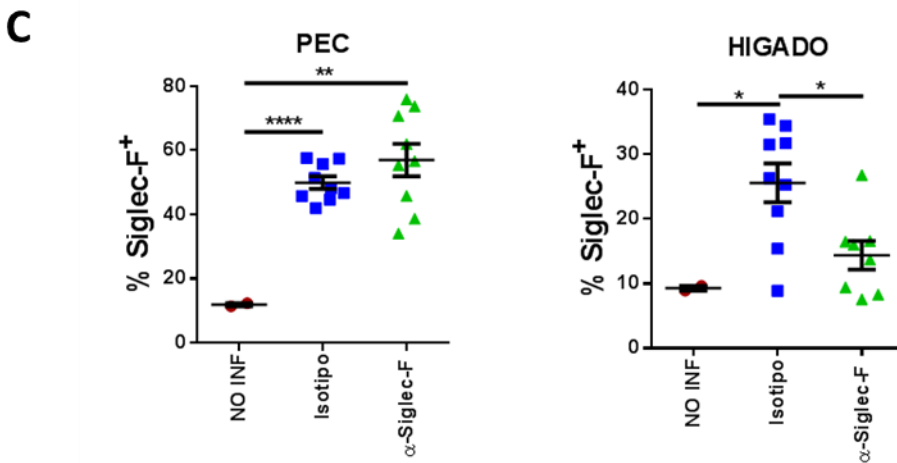


Figura 3.16. Depleción de eosinófilos en animales infectados por *F. hepatica*. A) Se muestra un esquema del diseño experimental utilizado. Ratones BALB/c fueron infectados con 5 metacercarias de *F. hepatica*. Se les administró 15 µg de anticuerpo anti Siglec-F o control isotipo el día previo y siguiente a la infección, y a los 3, 6, 9, 13, 16 y 17 días post infección. Los animales fueron sacrificados a los 17 o 21 días post-infección y se analizó la respuesta de linfocitos T mediante citometría de flujo y ELISA, la respuesta humoral mediante ELISA, la acumulación de citoquinas y quimioquinas en ascitis mediante ELISA y la expresión de citoquinas y moléculas reparadoras de tejido por qRT-PCR. **B y C)** Depleción de eosinófilos en PEC, hígado y bazo. Se muestra el porcentaje de células Siglec-F⁺ en animales infectados tratados con anticuerpo α-Siglec-F o control isotipo, y en animales no infectados. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, P<0,0001; ***, P<0,001; **, P<0,01; *, P<0,05.

Posteriormente, analizamos los signos clínicos y el daño hepático presente en los diferentes grupos de animales a través de la asignación del score clínico y medición de la actividad alanina transaminasa en suero, como ya se explicó previamente. Tanto el score clínico (Figura 3.17 A) como el daño hepático (Figura 3.17 B) fueron mayores en el grupo de animales infectados y depletados de eosinófilos en comparación con el grupo infectado control. El aumento del daño en este grupo también pudo observarse macroscópicamente (Figura 3.17 C). El hígado de los animales tratados con el anticuerpo α -Siglec-F presentó mayores áreas necrosadas y mayor inflamación que el hígado de los animales tratados con el control isotipo.

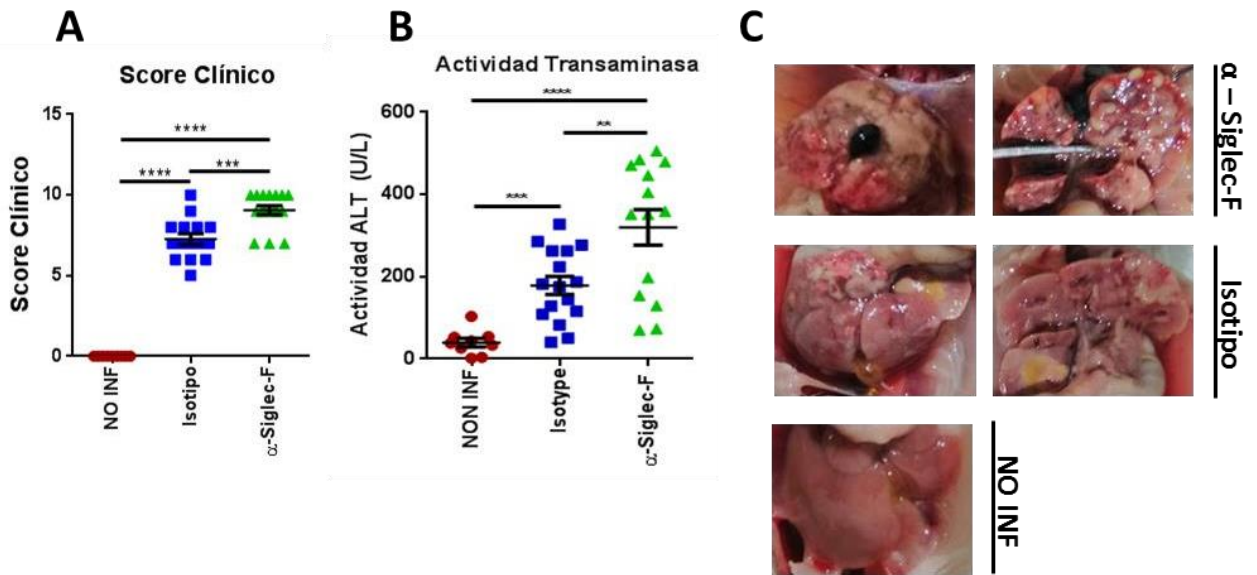


Figura 3.17. La depleción de eosinófilos se asocia a un mayor daño hepático inducido por *F. hepatica*. **A)** Score clínico que se obtuvo a partir de la tabla 2.1 (ver sección materiales y métodos). **B)** Medición de la actividad alanina transaminasa. Se obtuvo suero de animales infectados tratados con anticuerpo α -Siglec-F o control isotipo y de animales no infectados, y se calculó la actividad de las enzimas mediante un kit comercial. **C)** Imágenes que ilustran el daño hepático en animales pertenecientes a los tres grupos. Se muestran resultados de dos ensayos independientes. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, P<0,0001; ***, P<0,001; **, P<0,01; *, P<0,05.

En conjunto, estos resultados sugieren un rol de los eosinófilos en limitar el daño hepático inducido por *F. hepatica* durante la infección.

La depleción de eosinófilos determina un aumento en la concentración de CCL11, TSLP e IL-5 en ascitis de animales infectados

Considerando que los niveles de CCL11, TSLP e IL-5 están asociados con la presencia de eosinófilos y el daño hepático durante la infección experimental, se cuantificó los niveles de esta quimioquinas y citoquinas en ascitis de animales infectados depletados de eosinófilos y controles. En los tres casos se observó un aumento en la concentración de estas moléculas en los animales infectados en comparación con los no infectados, si bien esta diferencia solo resultó significativa para CCL11 (Figura 3.18). Además, los animales infectados y depletados de eosinófilos presentaron un aumento de las tres moléculas en relación a los ratones infectados control, siendo este aumento significativo para CCL11 y TSLP.

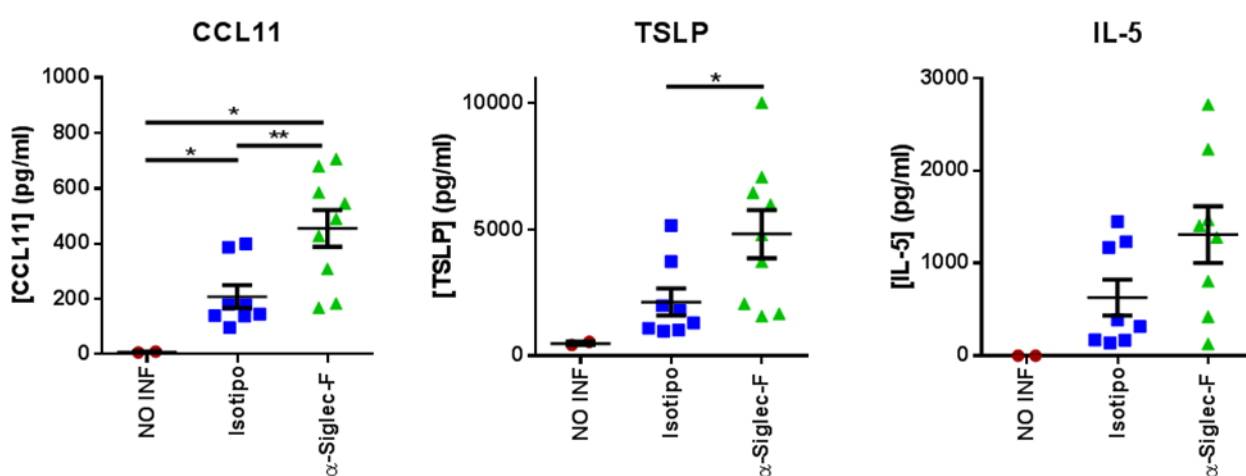


Figura 3.18. Cuantificación de CCL11, TSLP e IL-5 en ascitis de animales infectados tratados con anticuerpos α -Siglec-F, control isotipo y animales no infectados. Se obtuvo ascitis de animales infectados tratados con el anticuerpo α -Siglec-F o control isotipo y de animales no infectados y se evaluaron los niveles CCL11, TSLP e IL-5 mediante ELISA. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

Estos datos indican que en ausencia de eosinófilos, aumenta la concentración de la citoquina CCL11 y TSLP, posiblemente como mecanismo para compensar la falta de eosinófilos.

Los eosinófilos limitan el desarrollo de una respuesta T reguladora durante la infección por *F. hepatica*

Con el fin de investigar si los eosinófilos contribuyen al desarrollo de la respuesta T durante la infección por *F. hepatica*, se obtuvieron esplenocitos totales y leucocitos hepáticos de los animales infectados y controles y se analizaron las poblaciones de linfocitos T, así como la expresión de diversas citoquinas por citometría de flujo.

Como se describió anteriormente, los animales infectados control presentaron una disminución en la frecuencia de linfocitos T CD4⁺, tanto en hígado (Figura 3.19 A) como en bazo (Figura 3.19 B). Un resultado similar fue observado para la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ provenientes de los animales infectados depletados de eosinófilos, no encontrándose diferencias significativas con el grupo infectado control.

El análisis de los linfocitos T CD4⁺ que expresan Foxp3 demostró un aumento (aunque no significativo) de estas células en los animales infectados control en relación a los no infectados, tanto en hígado (Figura 3.19 A) como en bazo (Figura 3.19 B). Sin embargo, no se detectaron diferencias en la frecuencia de linfocitos CD4⁺ FoxP3⁺ en los animales infectados depletados de eosinófilos (Figura 3.19).

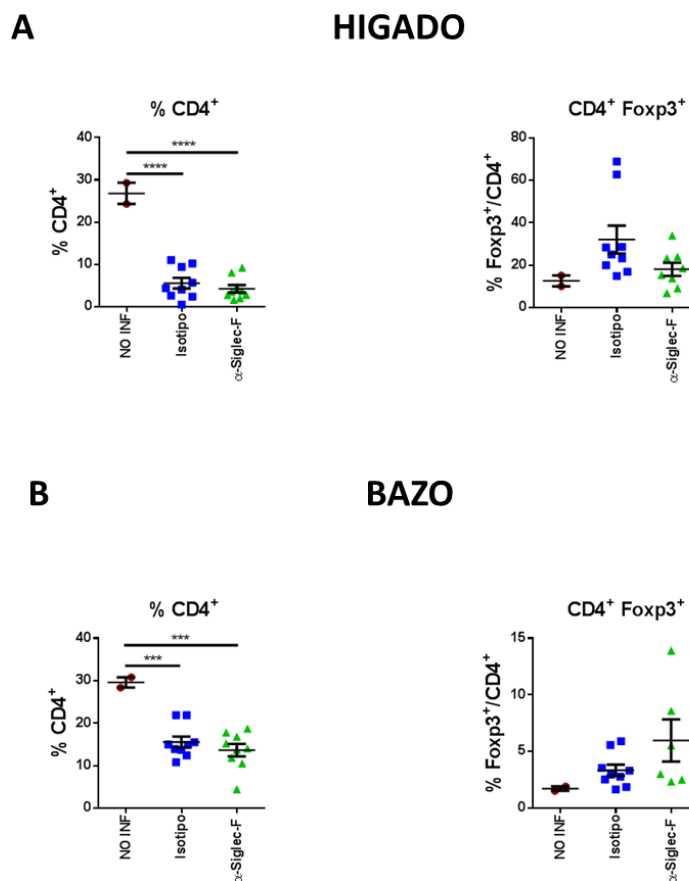


Figura 3.19. Caracterización de la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ en animales infectados depletados o no de eosinófilos. A) Frecuencia de linfocitos T CD4⁺ en el hígado de animales infectados tratados con el anticuerpo α-Siglec-F o control isotipo y animales no infectados. Se obtuvieron leucocitos hepáticos, se marcaron con anticuerpos específicos para CD4 y Foxp3 y se analizaron por citometría de flujo. **B)** Frecuencia de linfocitos T CD4⁺ en el bazo de animales infectados tratados con el anticuerpo α-Siglec-F o control isotipo y animales no infectados. Se obtuvieron esplenocitos totales, se marcaron con anticuerpos específicos para CD4 y Foxp3 y se analizaron por citometría de flujo.

Sin embargo, se observó un aumento significativo en la expresión de IL-10, pero no de IFN- γ e IL-4, en los linfocitos T CD4⁺ del hígado y bazo de los animales infectados tratados con el anticuerpo α -Siglec-F en relación con los animales infectados controles (Figura 3.20). Se obtuvo un resultado similar para la expresión de IL-10 por los linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ de hígado (Figura 3.20 A).

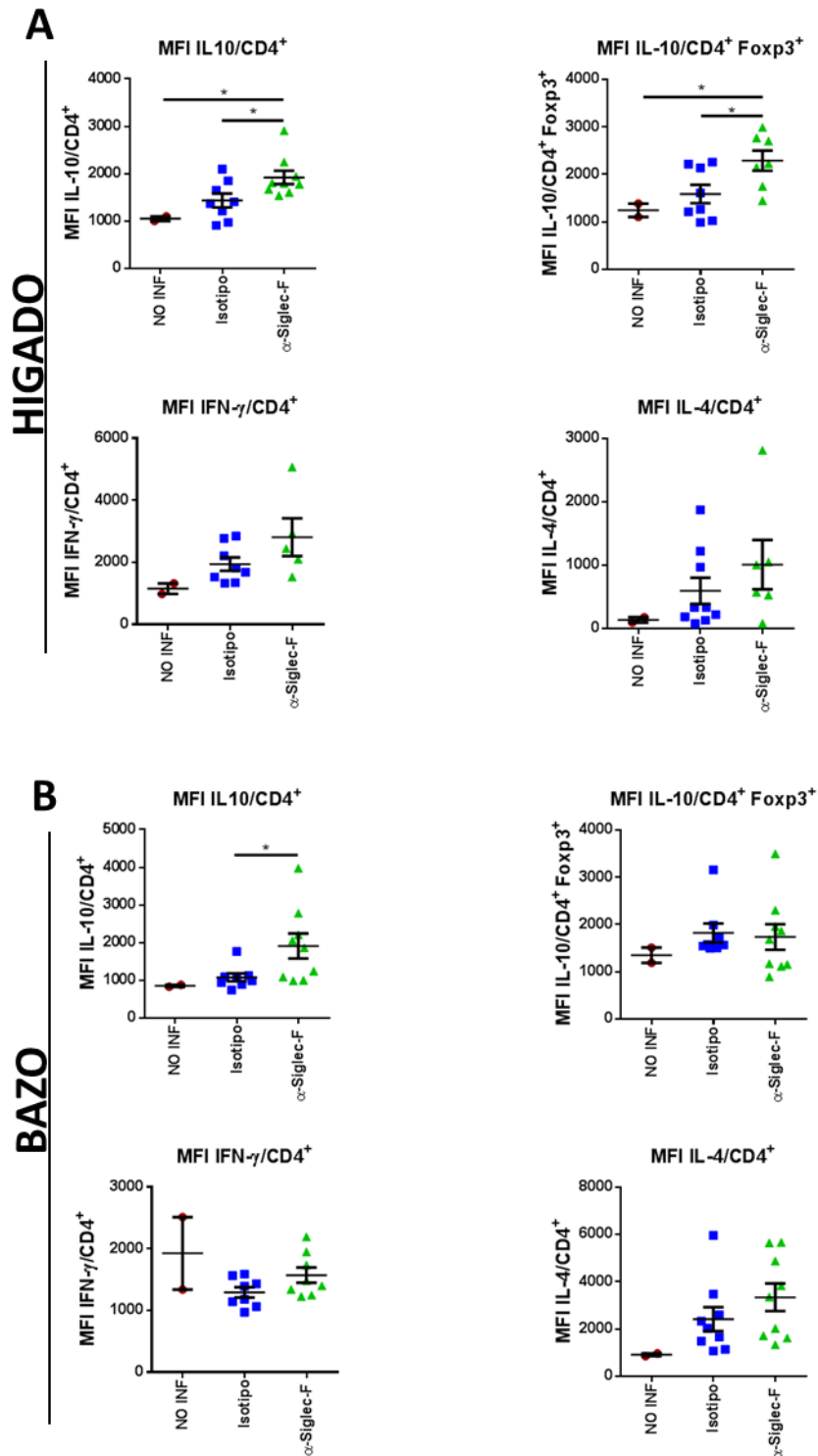


Figura 3.20. Producción de IL-10, IL-4 e IFN- γ por linfocitos T CD4⁺ en animales infectados y tratados con el anticuerpo α -Siglec-F. Se obtuvieron leucocitos hepáticos (A) y esplenocitos totales (B) de animales infectados tratados con el anticuerpo α -Siglec-F o con el control isotipo y de animales no infectados. Se marcaron las células con anticuerpos específicos para CD4, IFN- γ , IL-4 e IL-10 y se analizaron por citometría de flujo. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, P<0,0001; ***, P<0,001; **, P<0,01; *, P<0,05.

Continuando con el estudio de la respuesta T en ausencia de eosinófilos, se midió el nivel de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos de animales no infectados, y de animales infectados y tratados con el anticuerpo α -Siglec-F o control isotipo. Al estimular estos esplenocitos con moléculas parasitarias (FhTE), se observó una disminución significativa en la producción de IFN- γ , IL-4 e IL-5 en el grupo de ratones infectados y tratados con el anticuerpo α -Siglec-F con respecto al grupo infectado control isotipo (Figura 3.21). Por el contrario, se obtuvo un aumento significativo en la producción de IL-10 en los animales tratados con el anticuerpo α -Siglec-F, en comparación con los animales tratados con el control isotipo (Figura 3.21).

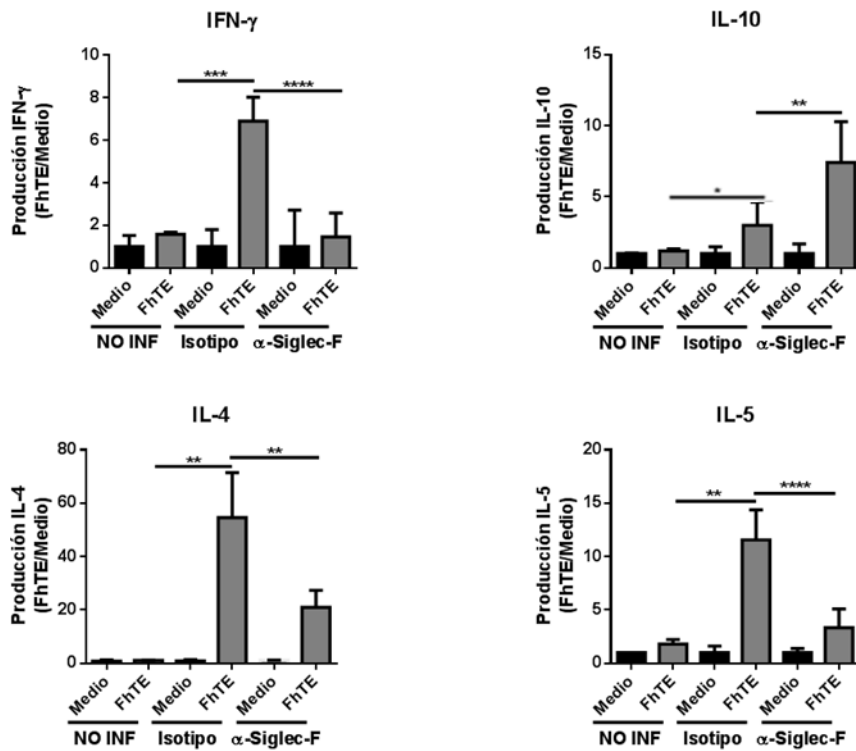


Figura 3.21. Producción de citoquinas por esplenocitos estimulados con lisado parasitario (FhTE). Esplenocitos totales de animales pertenecientes a los tres grupos fueron cultivados con FhTE o medio como control. Luego de 5 días de cultivo, se cuantificaron las citoquinas presentes en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA sándwich. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

Colectivamente, estos resultados indican que los eosinófilos podrían estar limitando el desarrollo de una respuesta T reguladora en el hígado y bazo, al limitar la expresión y producción de IL-10 por los linfocitos T $CD4^+$ y promoviendo la respuesta efectora tanto Th1 como Th2, favoreciendo la producción de IFN- γ , IL-4 e IL-5 por linfocitos T cooperadores específicos.

Los eosinófilos provenientes de animales infectados limitan la expansión de linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ inducidos por el parásito en condiciones in vitro

Para complementar el estudio *in vivo* sobre el papel de los eosinófilos en limitar la respuesta T CD4 reguladora, analizamos la capacidad de los eosinófilos de limitar la expansión de linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ inducidos por el parásito. Con tal fin, se co-cultivaron eosinófilos peritoneales de animales infectados con esplenocitos o linfocitos T CD4⁺ provenientes de animales infectados, los cuales fueron a su vez estimulados con moléculas parasitarias (FhTE) o ConA, respectivamente (Figura 3.22 A). Luego de 5 días de cultivo, se evaluó la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ por citometría de flujo. En ambos casos, en presencia de eosinófilos de animales infectados, se observó una disminución de la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ (Figura 3.22 B y C).

Estos resultados *in vitro* sugieren que los eosinófilos podrían estar limitando el desarrollo de una respuesta T reguladora durante la infección por *F. hepatica*, al inhibir la expansión de linfocitos T CD4⁺ en linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺.

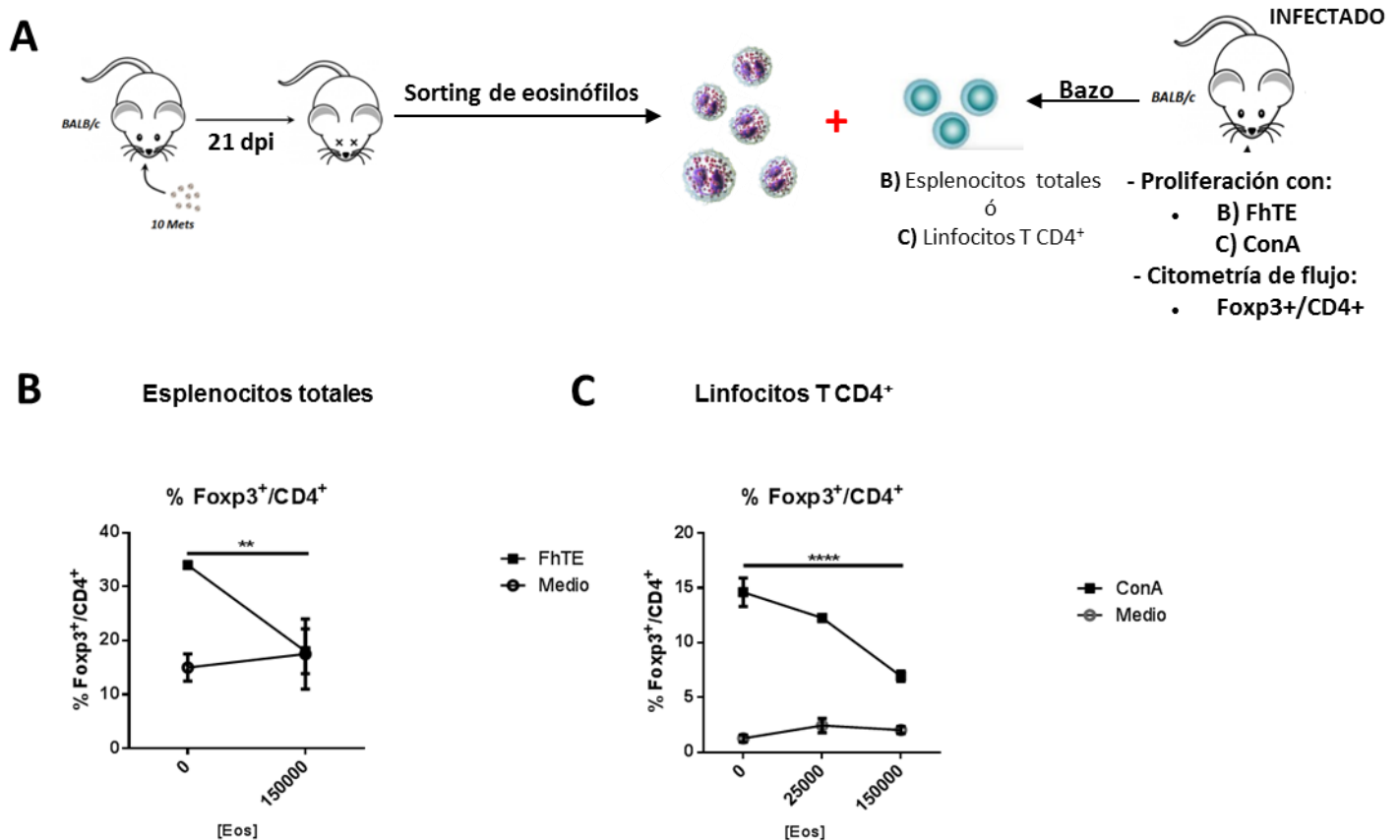


Figura 3.22. Los eosinófilos limitan la expansión de linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ inducidos por el parásito. A) Esquema del diseño experimental. Se obtuvieron eosinófilos peritoneales purificados mediante sorting y se co-cultivaron con esplenocitos totales (B) o linfocitos T CD4⁺ (C) provenientes de animales infectados, los cuales se estimularon con FhTE (B) o ConA (C) por 5 días a 37°C. Posteriormente, se analizó la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁺ por citometría de flujo. Se aplicó el test two-way ANOVA seguido del test de Tukey de comparación múltiple. ****, P<0,0001; ***, P<0,001; **, P<0,01; *, P<0,05. Los asteriscos indican la diferencia significativa entre, 1) 0 y 150000 eosinófilos con FhTE y 2) 0 y 150000 eosinófilos con ConA.

La depleción de eosinófilos causa un aumento en la expresión génica de la citoquina reguladora TGF- β

Con el fin de profundizar en el posible rol de los eosinófilos en el hígado durante la infección por *F. hepatica*, se analizó la expresión de diferentes genes implicados en la respuesta inmune y en el proceso de fibrosis. Para ello, se obtuvo ADNc de muestras de tejido hepático de animales infectados tratados con el anticuerpo α -Siglec-F o control isotipo y de animales no infectados, y se realizó qRT-PCR para estudiar la expresión génica de IL-4, IL-10, TGF- β y FIZZ1, entre otros genes no mostrados.

Se observó un aumento en la expresión génica de TGF- β , IL-10 y FIZZ1 en el hígado de los animales infectados y tratados con α -Siglec-F en comparación a los infectados tratados con control isotipo, aunque dicha diferencia fue significativa únicamente para TGF- β (Figura 3.23).

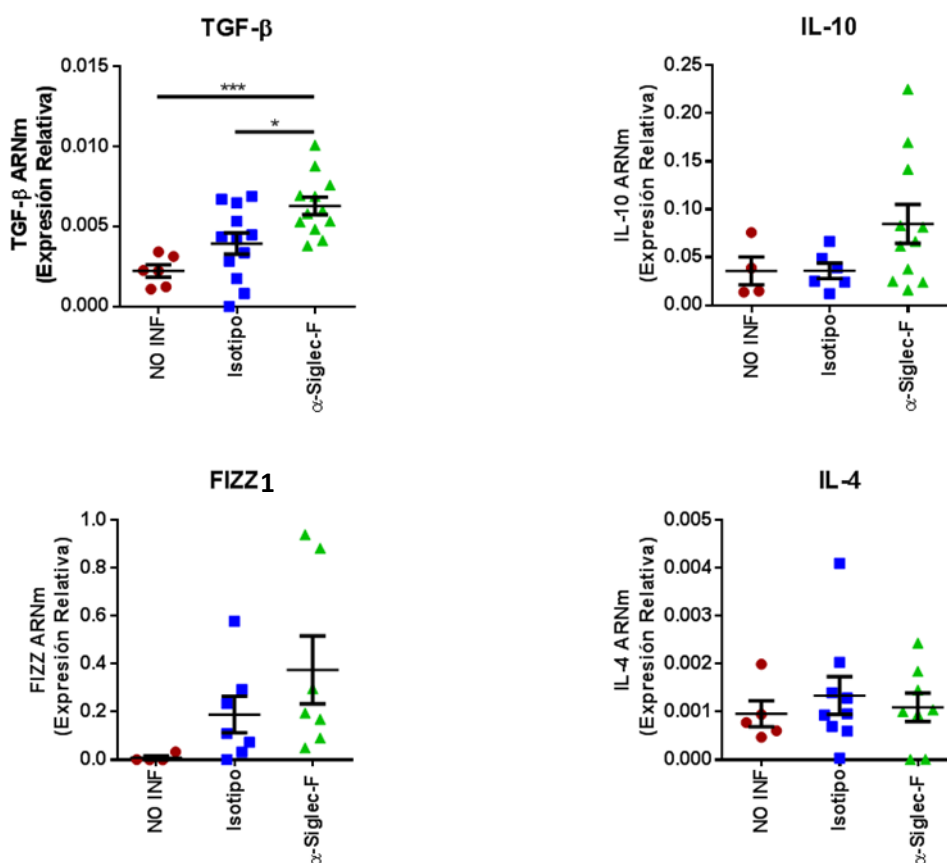
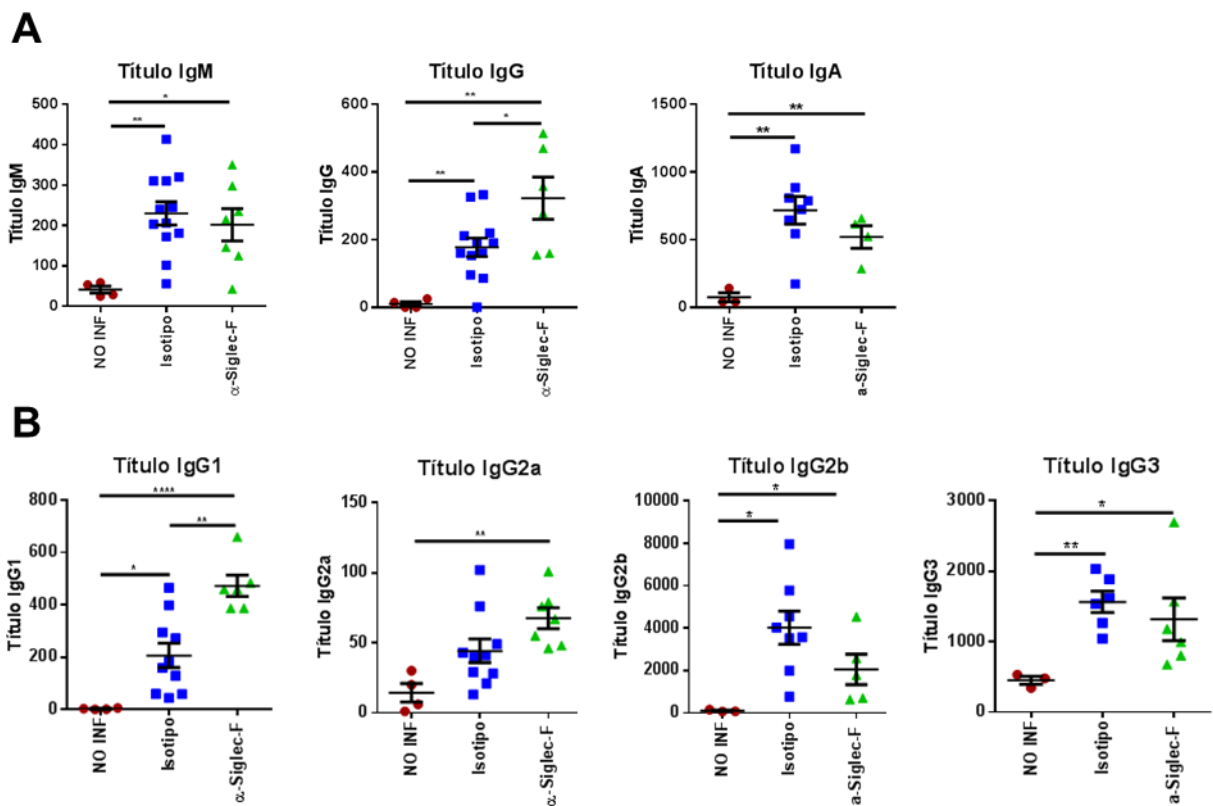


Figura 3.23. Aumento en la expresión de TGF- β en el hígado de los animales infectados y tratados con el anticuerpo α -Siglec-F. A partir de tejido hepático perteneciente a animales infectados tratados con anticuerpo α -Siglec-F o control isotipo y a animales no infectados, se midió la expresión génica de TGF- β , IL-10, FIZZ1 e IL-4 mediante qRT-PCR. Se muestran los resultados relativos a la expresión génica de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que fue utilizada como control endógeno. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

Los eosinófilos determinan el tipo de respuesta inmune humoral en animales infectados por *F. hepatica*

Para estudiar el posible rol modulador de los eosinófilos en el desarrollo de la respuesta inmune humoral en la infección por *F. hepatica*, se obtuvo suero de animales infectados y tratados con el anticuerpo α -Siglec-F o control isotipo y suero de animales no infectados y se analizó el título de anticuerpos específicos para *F. hepatica* mediante ELISA.

Conjuntamente, se observó un aumento en el título de los anticuerpos IgM, IgG e IgA específicos del parásito en animales infectados en comparación con los no infectados (Figura 3.24 A). Inesperadamente, se observó un mayor título de anticuerpos IgG específicos del parásito en animales infectados y tratados con anticuerpo α -Siglec-F en comparación con los infectados controles (Figura 3.24 A, panel central).



El aumento de los anticuerpos IgG específicos en animales infectados y depletados de eosinófilos se correlacionó con un aumento en el título de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos (Figura 3.24 B), mientras que no se observaron diferencias entre el título de los anticuerpos específicos IgG2b e IgG3 de los grupos infectados depletados y controles.

Estos resultados indican que la depleción de eosinófilos se asocia a un aumento de IgG específicas del parásito, particularmente de IgG1 e IgG2a, en animales infectados.

Estudio de la capacidad de los anticuerpos presentes en animales infectados de mediar la degranulación de eosinófilos

Para evaluar si los anticuerpos generados en los ratones infectados y tratados con el anticuerpo α -Siglec-F o control median la degranulación de eosinófilos, realizamos un experimento de degranulación de BM-Eos similar al descrito en la Figura 3.13 B. Para ello se incubaron BM-Eos diferenciados a partir de animales infectados con sueros de los dos grupos de animales infectados en presencia o ausencia de lisado parasitario (FhTE) y se evaluó la degranulación de eosinófilos a través de la medición de la actividad peroxidasa EPO y mieloperoxidasa MPO liberada por la degranulación de los eosinófilos.

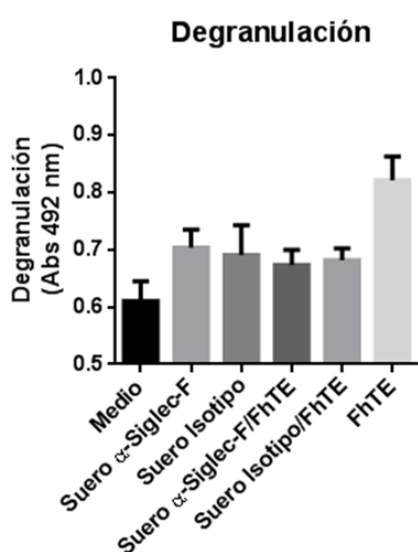


Figura 3.25. Degranulación de eosinófilos en presencia de suero de animales infectados y tratados con el anticuerpo α -Siglec-F o control isotipo.

Se diferenciaron eosinófilos a partir de células de la médula ósea de ratones infectados por *F. hepatica*, y se cultivaron por 1 hora en presencia de FhTE y diferentes diluciones de sueros de animales tratados con anticuerpo α -Siglec-F o control isotipo. Finalmente, se evaluó la degranulación de los eosinófilos a partir de la liberación de la peroxidasa del eosinófilo (EPO) y de la mieloperoxidasa (MPO), colocando una solución que contiene OPD, buffer Tris pH 8 y peróxido de hidrógeno, y midiendo la absorbancia a 492 nm. Se aplicó el t-test de dos colas. ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

No se observaron diferencias en el nivel de degranulación al incubar los BM-Eos con suero provenientes de animales tratados con α -Siglec-F en comparación al control isotipo (Figura 3.25). Sin embargo, es importante resaltar que dicho experimento fue preliminar, utilizando suero de dos animales de los grupos infectados, y que debería repetirse para confirmar estos resultados.

4- Discusión y Perspectivas

En esta tesis se caracterizaron los eosinófilos durante la infección experimental murina por *F. hepatica*, y se estudió su capacidad inmunomoduladora durante dicha infección. A continuación, se discutirán aspectos que se consideran interesantes sobre los resultados obtenidos.

Identificación de eosinófilos en la infección experimental murina por *F. hepatica* y su caracterización

En primer lugar, se evidenció que los eosinófilos son reclutados a la cavidad peritoneal durante la infección, un 50% del porcentaje celular respectivamente. En el caso del hígado, alrededor de un 25% de las células recuperadas mediante centrifugación con gradiente de Percoll (sin realizar un tratamiento de digestión enzimática) son eosinófilos. Los eosinófilos representan uno de los componentes fundamentales de la respuesta desarrollada contra parásitos helmintos, siendo reclutados a diversos órganos en infecciones por nematodos y trematodos. Por ejemplo, se ha detectado el reclutamiento de eosinófilos en especies de nematodos parásitos como *N. brasiliensis* y no parásitos como *Caenorhabditis elegans* en cultivos tridimensionales (176) y en infecciones experimentales por *B. malayi* y *Angiostrongylus cantonensis* en ratones (177, 178). También se ha registrado el reclutamiento de eosinófilos en infecciones por trematodos. Por ejemplo, en una infección experimental murina por *S. mansoni*, se registró un número de alrededor de 5 millones de eosinófilos en la cavidad peritoneal de animales infectados (179), mientras que en nuestro caso el número absoluto de eosinófilos en la cavidad peritoneal en animales con score de infección 6-8 fue de alrededor de 8 millones. Sin embargo, no existen hasta el momento reportes de la evolución en el reclutamiento de los eosinófilos a medida que transcurre la infección, lo cual se muestra en este trabajo. En la cavidad peritoneal, el porcentaje de eosinófilos aumenta de forma significativa a partir del score clínico de 5, mientras que en el hígado lo hace a partir de un score clínico asociado a alto daño hepático (9-10). Este fenómeno puede ser explicado muy posiblemente por el ciclo de vida de *Fasciola*, el cual primeramente atraviesa la pared intestinal para pasar a la cavidad peritoneal, para finalmente ingresar al parénquima hepático y residir en el hígado. De esta manera, el porcentaje de eosinófilos en el hígado aumenta en las últimas etapas de la infección, que se corresponden con un mayor score clínico. La presencia de un mayor porcentaje de eosinófilos en la cavidad peritoneal con respecto al hígado podría deberse al hecho de que cuando el parásito atraviesa el intestino se encuentra desprotegido, resultando en un momento idóneo para que se den mecanismos efectores mediados por estas células, como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Además, en dicho momento el parásito se encuentra en su estado juvenil, siendo más pequeño y más lábil.

En concordancia con lo explicado anteriormente, se esperaría que la concentración de quimioquinas y citoquinas que promueven el reclutamiento, supervivencia y diferenciación de eosinófilos, como CCL11, TSLP e IL-5 aumente a medida que aumenta el porcentaje de eosinófilos. En efecto, se observó un aumento en la concentración de estas moléculas en la ascitis de ratones presentando un score clínico alto. Sin embargo, no se observaron diferencias en el nivel de estas moléculas en suero. Una posible explicación para esto es que en ningún momento aumentaría de forma pronunciada el porcentaje de eosinófilos en el suero de

animales infectados, aunque esto no fue comprobado directamente en este trabajo, pudiendo ser un aspecto a investigar. Estas moléculas, además, ejercen influencia en la polarización de la respuesta inmune hacia el tipo Th2, apoyando resultados previos del laboratorio que indican que *F. hepatica* induce una respuesta inmune de este tipo (192).

Existen algunos marcadores que pueden ser utilizados para distinguir a los eosinófilos murinos, como Siglec-F y CCR3 (180, 181). En este trabajo se buscó profundizar en la caracterización de los eosinófilos en la infección experimental por *F. hepatica* en ratones, por lo que se estudió la expresión de otros marcadores, además de los nombrados anteriormente. Lo que se observó fue que los eosinófilos también expresan un alto nivel de Ly6G, CD44, CD162, Sirp- α y CD11b. Por el contrario, no expresan, o lo hacen en bajo nivel, MHCII, CD80, CD4, CD8 y CD64.

CCR3 es el receptor para CCL11, por lo que es un marcador característico de eosinófilos y de eosinófilos en migración (182). La expresión de este marcador resultó ser levemente mayor en los eosinófilos hepáticos en comparación a los del PEC, lo cual indica que debieron migrar para llegar a este sitio. Los eosinófilos también expresaron altos niveles de las moléculas CD44 y CD162, si bien dicha expresión fue mucho mayor en los eosinófilos hepáticos. CD44 es una molécula de adhesión celular que posee un rol importante en el reclutamiento y extravasación de leucocitos, y participa en la unión con la matriz extracelular y la comunicación con citoquinas (183). En cuanto a los eosinófilos, existen reportes de que CD44 se expresa constitutivamente en eosinófilos en estado basal y su expresión aumenta cuando son activados. De hecho, se encuentra reportado que alrededor del 40 al 60% de los eosinófilos humanos en circulación expresan CD44, mientras que su expresión aumenta hasta un 80% en eosinófilos activados que se encuentran en tejidos (184). Dicho aumento en la expresión de CD44 en eosinófilos activados ha sido evidenciado en algunas patologías, como el asma o alergias (185, 186). Asimismo, se ha observado que la expresión de CD44 en eosinófilos activados se concentra en un solo sitio de la célula, formando un uropodo conteniendo al núcleo, lo que implica cambios morfológicos (99). CD162 (también conocido como PSGL-1) es un ligando de P-selectina, y se expresa en leucocitos en condiciones inflamatorias. Media la adhesión al endotelio a través de la unión a la P-selectina y la adhesión de leucocitos entre sí al unirse a la L-selectina. Este último hecho se ha demostrado *tanto in vitro* como *in vivo* (187). En relación a los eosinófilos, se encuentra reportado que CD162 es otro marcador que caracteriza a los eosinófilos activados (184). CD11b, por su parte, es una integrina que también se expresa en altos niveles en eosinófilos activados (188). Particularmente en este trabajo citado, se vio que eosinófilos activados que expresan CD11b se encuentran en contacto con células tumorales, y las eliminan a través de enzimas liberadas en la degranulación. Por lo tanto, el hecho de que los eosinófilos hepáticos expresen un mayor nivel de CD44, CD162 y CD11b que los eosinófilos del PEC, estaría indicando que los primeros presentan un mayor nivel de activación. Al inicio de la infección, podrían estarse reclutando una gran cantidad de eosinófilos a la cavidad peritoneal, pero teniendo los mismos un bajo estado de activación. Por el contrario, los eosinófilos en el hígado podrían alcanzar un mayor estado de activación y maduración, siendo capaces de llevar a cabo mecanismos efectores contra el parásito cuando se encuentran en el parénquima hepático. Otra molécula que indica el estado de activación del eosinófilo y podría haber sido interesante de evaluar en esta tesis es CD63, ya que es un marcador de degranulación (189).

Por otro lado, otra molécula a destacar es Sirp- α , la cual posee una alta expresión tanto en eosinófilos de PEC como de hígado. Esta molécula regula la homeostasis del eosinófilo, entre otras cosas a través de la regulación del proceso de degranulación, y constituye una señal importante de supervivencia durante la inflamación (68), por lo que su alta expresión en el PEC e hígado podría estar colaborando con la supervivencia de los eosinófilos en estos tejidos.

Se encuentra reportado que los eosinófilos pueden expresar MHCII y moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 en infecciones helmínticas (190). Además se ha comprobado que estas células pueden migrar a los nódulos linfáticos y estimular linfocitos T CD4⁺ en forma dependiente del antígeno, resultando en la proliferación de linfocitos T y producción de citoquinas (191). En nuestro modelo de infección por *F. hepatica*, los eosinófilos mostraron una baja expresión de MHCII y CD80, por lo que no habría indicios de que estuvieran actuando como APCs durante la infección. Sin embargo, trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que durante la infección por *F. hepatica*, la expresión de MHCII en DCs disminuye, indicando un mecanismo de inmunoregulación llevado a cabo por el parásito (192). Una hipótesis es que lo mismo ocurra con los eosinófilos, evitando que los mismos actúen como APCs no profesionales y activen a los linfocitos T CD4⁺. Para demostrar esta hipótesis deberíamos estudiar la expresión de estas moléculas durante la infección parasitaria y evaluar si la misma es modificada.

Mecanismos efectores mediados por eosinófilos durante la infección experimental por F. hepatica

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) pueden inducir daño en la superficie de parásitos helmintos durante el proceso de inflamación. Los eosinófilos producen ROS y RNS en infecciones helmínticas, y también se encuentran asociadas a la formación de EETs en eosinófilos humanos (193). En esta tesis se demostró el aumento en la expresión de ROS y RNS en eosinófilos del PEC de animales infectados en comparación con los no infectados. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la expresión de estas moléculas en eosinófilos hepáticos. El aumento en la expresión de ROS y RNS se correlaciona con el estado de activación del eosinófilo, el cual produce especies reactivas del oxígeno y nitrógeno para eliminar al parásito. Resultaría interesante comprobar si la alta expresión en los eosinófilos del PEC de animales infectados se correlaciona con la generación de EETs. Para ello, se deberían disponer eosinófilos de animales infectados y no infectados en láminas y marcarlos con alguna molécula característica que esté presente en las EETs, como un anticuerpo anti-MBP (194).

Diferentes mecanismos efectores por parte de los eosinófilos para eliminar a los parásitos helmintos han sido comprobados *in vitro* (195, 196). También ha sido observado *in vivo*, si bien solo en el caso de larvas (195, 197), poniendo en duda su efectividad para eliminar parásitos adultos. En cuanto a los mecanismos efectores que ejercen protección en la infección por *F. hepatica*, al estudiar la respuesta inmune en la pared intestinal de ratas Wistar infectadas por *F. hepatica*, no se observó un aumento en la frecuencia de células IgM, IgG2a, IgG1 e IgA positivas aunque sí un aumento en eosinófilos y mastocitos. Sin embargo, al estudiar la respuesta inmune *ex vivo* en un segmento de intestino desafiado con NEJs, se vio que los NEJs que migraban en la submucosa intestinal se encontraban cubiertos por anticuerpos IgG1 e

IgG2a, rodeados por eosinófilos, sugiriendo que los mismos estarían ejerciendo un mecanismo efector a través de los anticuerpos (198).

En este trabajo se buscó evidenciar mecanismos efectores de los eosinófilos durante la infección por *F. hepatica* en ratones. Primeramente, se comprobó que durante la infección se producen anticuerpos específicos de isotipo IgM e IgG. Los anticuerpos producidos durante la infección, al ser cultivados con eosinófilos derivados de la médula ósea de animales infectados, indujeron la degranulación de eosinófilos, sugiriendo un posible mecanismo de ADCC contra *F. hepatica*. En presencia de FhTE se registró un aumento en la degranulación solamente para la dilución de suero 1/50. Sería interesante realizar un ensayo utilizando, en vez de FhTE, metacercarias de *F. hepatica*, NEJs o incluso parásitos adultos, para evaluar si se da una mayor degranulación con menores niveles de anticuerpo. Por otro lado, para determinar si las IgG son las responsables de la inducción del proceso de degranulación se debería purificar las mismas, a través de una cromatografía de afinidad por ejemplo o bloquear al receptor de las IgG FcγR utilizando un anticuerpo específico. Por otro lado, la utilización de suero descomplementado descartaría un efecto del Sistema de Complemento en inducir la degranulación de los eosinófilos.

Por otra parte, resulta importante destacar que no se determinaron los anticuerpos IgE ya que los ratones carecen de receptores específicos para dicho isotipo (97).

Inhibición de la proliferación de linfocitos T por parte de eosinófilos de animales infectados por F. hepatica en condiciones in vitro

Trabajos previos de nuestro laboratorio indican que durante la infección murina experimental por *F. hepatica*, se genera una respuesta inmune polarizada hacia el subtipo Th2/Treg (192), con un aumento en la proporción de linfocitos T reguladores. Particularmente, se observó que glicanos de *F. hepatica* inducen DCs reguladoras, que inhiben la proliferación de linfocitos T a través de la generación de linfocitos T anérgicos (199). Además, en esta tesis mostramos que los animales infectados poseen niveles sensiblemente menores de linfocitos T, especialmente en el hígado y en el bazo. Considerando que otras células además de las DCs podrían estar contribuyendo a la inhibición en la proliferación de linfocitos T durante la infección, en este trabajo nos propusimos investigar si los eosinófilos podrían mediar la inhibición de la proliferación en los linfocitos T. Los datos obtenidos adjudican un rol a los eosinófilos en la inhibición de la proliferación de linfocitos T *in vitro*. Es importante destacar que la inhibición de linfocitos T se observó también utilizando eosinófilos sorteados con muy alta pureza, lo que descarta la participación de otro tipo celular. La inhibición de linfocitos T por parte de eosinófilos ya había sido reportada previamente en otros contextos, por ejemplo en eosinófilos humanos a través de la galectina 10 o en un modelo bacteriano donde los eosinófilos murinos suprimen la proliferación y liberación de citoquinas por parte de los linfocitos T en el tracto gastrointestinal a través de la molécula PD-L1 (77, 115). En relación a esto, resultaría interesante averiguar por medio de que molécula o interacción se estaría dando esta inhibición de los linfocitos T observada en este trabajo, y si la misma es dependiente del contacto célula-célula o si se está dando a través de mediadores solubles. Sin embargo, al efectuar el ensayo de infección en animales depletados de eosinófilos, no se

observaron diferencias en la frecuencia de linfocitos T peritoneales o hepáticos, lo que estaría indicando que los eosinófilos, a pesar de ser capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro*, no controlan su proliferación *in vivo* durante la infección parasitaria, o que la misma no se evidencia a los 21 dpi. En este sentido, sería interesante evaluar la frecuencia de linfocitos T a diferentes etapas de la infección experimental en animales depletados de eosinófilos y controles. Por último, se podría también analizar la frecuencia de linfocitos T proliferantes a través de la expresión de la molécula Ki67.

Rol de los eosinófilos durante la infección experimental por F. hepatica

Uno de los objetivos de este trabajo de maestría fue evaluar si los eosinófilos poseen un rol en el desarrollo de la respuesta inmune frente a *F. hepatica*, y si contribuyen al daño hepático inducido por el parásito. Para cumplir con este objetivo, se utilizó un anticuerpo α -Siglec-F con la intención de depletar a los eosinófilos en ratones infectados.

Al analizar el aspecto macroscópico del hígado, el score clínico y la actividad de la enzima alanina-transaminasa, se observó que los ratones tratados con anticuerpo α -Siglec-F poseían un daño hepático mayor que los tratados con el control isotipo, lo cual sugiere que los eosinófilos limitan el daño hepático durante la infección por *F. hepatica*. El mayor daño hepático en ausencia de eosinófilos puede explicarse, en parte, a la falta de los mecanismos efectores clásicos que dichas células estarían ejerciendo para eliminar el parásito. Por otra parte, los eosinófilos cumplen un rol en el proceso de reparación tisular, ya que son fuente de un amplio rango de citoquinas anti-inflamatorias y moléculas mediadoras de la inflamación. En particular, son fuente de TGF- β , citoquina implicada en la remodelación tisular y estimuladora de los fibroblastos a producir matriz extracelular, colaborando con la regeneración tisular (156). También existen evidencias de que los eosinófilos liberan metaloproteasas y estimulan la degradación y el re-arreglo del colágeno (200). En cuanto a los mediadores de la inflamación, se ha visto que los eosinófilos expresan al menos tres: lipoxina A4, resolvina E3 y protectina E1, los cuales tienen un potente efecto en la resolución de la inflamación (200). Por lo tanto, es probable que los eosinófilos estén colaborando con la reparación del tejido y el control de la inflamación durante la infección por *F. hepatica*, por lo que al depletarlos aumenta el daño hepático. Resultaría interesante investigar el mecanismo por el cual los eosinófilos estarían limitando dicho daño, por ejemplo si es a través de alguna de estas moléculas nombradas anteriormente. También podría realizarse una transferencia adoptiva de eosinófilos en animales infectados y evaluar si se da una mejoría en el daño hepático. Por otra parte, análisis de la expresión génica en el hígado de moléculas relacionadas con la reparación tisular, como TGF- β y FIZZ1, mostraron un aumento de estas últimas en el hígado depletado de eosinófilos. Posiblemente, frente al aumento de daño, hubo un aumento en la producción de estas moléculas por otras células presentes en el hígado, como los macrófagos.

Dada la alta correlación que existe entre una infección helmíntica y la alta concentración de eosinófilos en los tejidos y sangre, resulta razonable pensar que los eosinófilos participan en la defensa del huésped contra los parásitos. En condiciones *in vitro*, se ha demostrado que los eosinófilos son capaces de eliminar larvas de una gran variedad de helmintos. Por ejemplo, se ha demostrado que, en presencia de suero, los eosinófilos sanguíneos son capaces de matar

larvas de *S. mansoni* (201). Por otro lado, las larvas de *N. brasiliensis* son dañadas por eosinófilos *in vitro* de manera dependiente del complemento o el zimosan (202), y eosinófilos murinos pueden matar larvas recién nacidas de *T. spiralis in vitro*, en un mecanismo dependiente de anticuerpos (203).

A pesar de las numerosas evidencias del papel de los eosinófilos en la eliminación de helmintos *in vitro*, la relevancia que dichas células podrían tener para controlar a los helmintos *in vivo* resulta cuestionable. De hecho, en algunos casos, la depleción o ausencia de eosinófilos no parece tener un rol en la infección por el parásito, llegando incluso a favorecer a este último. Un ejemplo de esta situación es el trematodo *S. mansoni*, donde ni en ratones tratados con α -IL-5 ni en ratones depletados de eosinófilos genéticamente, como Δ dblGATA3 o PHIL, se le adjudicó un rol claro a los eosinófilos en la protección primaria contra la infección experimental (204, 145). En otro estudio, parece que el parásito se beneficia de una eosinofilia excesiva, ya que en ratones IL-5Tg la eliminación de parásitos del hígado seguido de una vacunación con cercarias irradiadas se vio impedida (205). Otra situación donde los eosinófilos son beneficiosos para el parásito es en la infección murina por *Heligmosomoides polygyrus*, donde animales deficientes de eosinófilos poseen una fecundidad disminuida en comparación con hembras desarrolladas en presencia de eosinófilos (113). Finalmente, se demostró que la ausencia de eosinófilos perjudica la supervivencia del larvas del nematodo *T. spiralis* en el músculo. Específicamente, se observó que los eosinófilos contribuyen a la supervivencia del estadio muscular de la larva, inhibiendo la producción de óxido nítrico, lo cual colabora con la eliminación de las larvas (206).

En esta tesis, no se evaluaron parámetros de supervivencia del parásito, fecundidad o número de parásitos en tejido. Sin embargo, dado que evidenciamos un aumento del daño hepático y una modulación de la respuesta T reguladora (dada por la supresión de la producción de IL-10) en animales depletados de eosinófilos, podemos indicar que, en la infección por *F. hepatica*, los eosinófilos serían beneficiosos para el huésped, pudiendo colaborar con la eliminación y el control del daño inducido por el parásito, si bien en esta tesis no se muestran evidencias directas de que los eosinófilos eliminen al parásito.

Por otro lado, existen varios trabajos que reportan el beneficio de los eosinófilos para el huésped en infecciones helmínticas. Por ejemplo, en la infección por *N. brasiliensis* en ratones depletados de IL-5 (142), KO para eotaxina (207) o ratones depletados de eosinófilos (142), se observó que los eosinófilos retienen a las larvas en la piel y disminuyen la carga parasitaria en los pulmones así como el arribo de los parásitos al intestino. Otro ejemplo es el de los parásitos helmintos de la especie *Filaria*, como *B. malayi*, donde ratones PHIL no pueden controlar la presencia de microfilarias en sangre luego de una inyección intravenosa con el parásito, además de aumentar su supervivencia en el peritoneo (208).

En cuanto a la inmunomodulación, nuestros resultados indican que los eosinófilos podrían ejercer un rol modulador en el desarrollo de la respuesta inmune celular durante la infección por *F. hepatica*, particularmente a través de la citoquina IL-10 producida por linfocitos T. En animales tratados con el anticuerpo α -Siglec-F, se observó un aumento en la expresión de IL-10 en linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ en el hígado y bazo, lo cual indica que los eosinófilos están limitando la producción de IL-10 por parte de los linfocitos T en los sitios anteriormente nombrados. Además, se vio que esplenocitos estimulados con FhTE de animales

tratados con anticuerpo α -Siglec-F producen más IL-10 en contraparte a los tratados con control isotipo. Estos resultados, en conjunto con la disminución de linfocitos T reguladores en presencia de eosinófilos *in vitro*, podrían indicar que los eosinófilos estarían limitando el desarrollo de una respuesta T reguladora durante la infección por *F. hepatica*. Dado que este parásito induce la producción de linfocitos T reguladores, los eosinófilos podrían actuar para intentar contrarrestar este mecanismo. En la misma línea que nuestros resultados, animales deficientes de las proteínas granulares EPO y MBP infectados por *Litomosoides sigmodontis*, una especie de Filaria, presentan un aumento de IL-10 en la cavidad torácica y una disminución de IL-5, indicando también un posible rol modulador de los eosinófilos que estaría mediado por estas proteínas. En este sentido, resultaría interesante profundizar en el rol de las proteínas granulares de los eosinófilos en la infección por *F. hepatica*, y evaluar si los efectos inmunomoduladores observados se encuentran mediados por estas proteínas. Por el contrario, en otros trabajos previos donde se estudió el rol modulador de los eosinófilos, como en el de Cadman *et al* (208), no se encontraron diferencias significativas en la respuesta de linfocitos T de animales infectados con *B. malayi* depletados de eosinófilos en relación a los animales control.

En conclusión, nuestros resultados indican que los eosinófilos son beneficiosos para el huésped durante la infección por *F. hepatica*, limitando la respuesta reguladora y permitiendo el desarrollo de una respuesta T más efectiva que favorezca la eliminación del parásito.

El aumento en la expresión de IL-10 por parte de los linfocitos T también se correlacionó con un mayor daño hepático. Aunque la IL-10 se ha visto implicada clásicamente en reacciones anti-inflamatorias, también se han observado situaciones donde parece potenciar el daño hepático. Luego de una injuria al hígado, especies reactivas del oxígeno y una gran variedad de citoquinas, dentro de las cuales se encuentra la IL-10, inician y mantienen las reacciones inflamatorias y la fibrosis hepática. Se ha visto un aumento en la expresión de IL-10 en patologías hepáticas que involucra una infección por el helminto *Mesocestoides vogae* (210). Por otro lado, en un estudio para evaluar la respuesta inmune en niños infectados con *Toxocara canis* y que presentaban daño hepático, se observó que la concentración de IL-10 en suero es mayor que la de IL-4 en situación de daño hepático, mientras que se da la situación inversa cuando no hay afectación de este órgano (211). Estos resultados indican que la citoquina IL-10 podría poseer un rol en la patogénesis hepática. En este sentido, se observó un aumento de IL-10 por parte de linfocitos T CD8⁺ asociado con un mayor daño hepático en un modelo murino de inflamación hepática producido por el síndrome de activación de macrófagos (MAS) (212).

Con la depleción de eosinófilos también se buscaba evaluar si los mismos tienen alguna influencia en el desarrollo de la respuesta inmune humoral frente a *F. hepatica*. En este sentido, existen reportes que los eosinófilos mantienen la producción de IgA en las placas de Peyer durante una infección por el nemátodo *H. polygyrus* (113). Además, la importancia de los eosinófilos para el desarrollo de las células plasmáticas y los linfocitos B y por lo tanto la producción de anticuerpos ya ha sido demostrada (107). Por otra parte, se encuentra reportado que *F. hepatica* induce la producción de anticuerpos específicos IgG1, IgG2a, IgM e IgE en el suero de ratas infectadas (209) y que los mismos ejercen protección, sobre todo IgG1. En esta tesis, se evidenció una producción de estos isotipos. Los anticuerpos IgE no fueron

evaluados en nuestro caso ya que este anticuerpo no es capaz de mediar ADCC en el ratón (209).

Al depletar de eosinófilos a ratones infectados por *F. hepatica*, se observó un aumento en los títulos de IgG totales, IgG1 e IgG2a en comparación con los títulos de animales tratados con control isotipo. Con el aumento en los títulos de IgG totales en animales tratados con anticuerpo α -Siglec-F, se investigó si la depleción posee alguna influencia en el mecanismo de degranulación *in vitro*. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias en la degranulación al utilizar suero de animales tratados con α -Siglec-F con respecto a los animales tratados con control isotipo. Sin embargo, estos resultados son preliminares y deben estudiarse con mayor profundidad, ya que solo se pudo obtener resultados de un único animal. De todas formas, se esperaría observar una menor degranulación en BM-Eos incubados con suero de animales α -Siglec-F, en caso de que los anticuerpos no fueran efectivos realizando funciones efectoras.

El aumento de anticuerpos IgG e IgG1 en animales depletados de eosinófilos podría deberse a un mecanismo compensatorio del sistema inmune del animal, el cual intenta contrarrestar los mecanismos efectoras de los eosinófilos ausentes con el aumento de anticuerpos. Este exceso de anticuerpos, sin embargo, no resultaría efectivo para controlar la infección, ya que los animales muestran un mayor daño hepático. En esta línea, resultaría de interés estudiar en mayor profundidad los anticuerpos específicos producidos durante la infección por *F. hepatica*, y por qué los mismos son ineficientes para controlar la infección, por ejemplo a través del estudio de los epítopes parasitarios que reconocen. Por otro lado, resultaría importante estudiar el rol de los eosinófilos en la generación de células plasmáticas, ya que podrían cumplir un rol en el proceso de generación de anticuerpos para hacerlos menos efectivos contra *F. hepatica*. Por último, una estrategia que podríamos realizar para determinar la función de los anticuerpos en eliminar o contener el daño inducido por el parásito sería realizar una transferencia pasiva de suero descomplementado de animales infectados y depletados de eosinófilos o controles a animales infectados.

El hecho de que los eosinófilos, a pesar de reclutarse en gran nivel, estar altamente activados durante la infección y de ser capaces de limitar el daño hepático inducido por el parásito, no logren eliminar al parásito, abre la posibilidad de que los mismos estén modulados por el parásito o de que no sean suficientes para eliminar al parásito. Los helmintos son ampliamente conocidos por su capacidad de inmunomodulación, lo cual trae problemas para el desarrollo de vacunas efectivas e impide la defensa del huésped frente a una co-infección viral o bacteriana, pero a su vez poseen un gran potencial para prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Estudios en animales indicaron mejoría de síntomas de varias enfermedades, como ser la diabetes tipo 1, colitis, encefalitis experimental, y artritis inducida por colágeno (200). Este hecho también fue visto en *F. hepatica*, donde el uso de extracto parasitario mejora los síntomas de la EAE, en un mecanismo dependiente del reclutamiento de eosinófilos (42). En este sentido, resulta importante conocer el efecto que los eosinófilos tienen sobre la respuesta inmune del parásito, en caso de que estos últimos sean utilizados en terapias inmunomoduladoras. A pesar de las funciones reguladoras de los eosinófilos aún no se encuentran del todo esclarecidas, cada vez más pacientes están siendo tratados con terapias que depletan eosinófilos, sobre todo en casos graves de asma (213). Por

lo tanto, resulta importante conocer los efectos que la depleción de eosinófilos tiene sobre el sistema inmune en varios modelos, entre ellos las infecciones helmínticas.

En los últimos tiempos, nuevas y prometedoras funciones inmunomoduladoras se le han adjudicado a los eosinófilos, por lo cual dejó de ser considerada como una célula meramente efectora. En el caso de las infecciones por helmintos, el rol que los eosinófilos poseen *in vivo* resulta controversial, ya que en ocasiones parecen favorecer al parásito y en otras al huésped. Este trabajo aporta datos para el esclarecimiento del rol de los eosinófilos durante las infecciones por helmintos, y aporta conocimiento en el área de este tipo celular, que resulta fascinante a pesar de ser menos estudiado que otras células del sistema inmune.

5- Conclusiones

En resumen, en este trabajo identificamos células Siglec-F⁺ F4/80^{int} correspondientes a eosinófilos que son reclutadas a la cavidad peritoneal e hígado en ratones infectados por *F. hepatica*. Además, comprobamos que el reclutamiento de los eosinófilos se asocia con un mayor daño hepático y signos clínicos más graves.

También demostramos que los eosinófilos reclutados al hígado y la cavidad peritoneal durante la infección por *F. hepatica* expresan altos niveles de moléculas características, como Siglec-F, CCR3 y Ly6G así como también moléculas relacionadas con el estado de activación del eosinófilo y su supervivencia, como CD44, CD162, CD11b y Sirp- α . Por último, la expresión de CD44, CD162 y CD11b fue mayor en eosinófilos hepáticos en comparación con eosinófilos de la cavidad peritoneal, por lo cual es posible concluir que los primeros se encuentran en un mayor estado de activación.

Una de las funciones efectoras de los eosinófilos fue comprobada *in vitro*, ya que se obtuvo que el suero de animales infectados, pero no el de los no infectados, es capaz de inducir degranulación en eosinófilos diferenciados provenientes de animales infectados.

Por último, los eosinófilos de animales infectados son capaces de regular la respuesta de los linfocitos T *in vitro*, inhibiendo su proliferación y producción de IFN- γ . Por otra parte, se vio que la polarización hacia linfocitos T reguladores en presencia de eosinófilos de animales infectados se ve disminuida, demostrando *in vitro* que los eosinófilos son capaces de regular la polarización de la respuesta T durante la infección.

El análisis del papel de los eosinófilos *in vivo* durante la infección parasitaria, a través de la depleción utilizando un anticuerpo α -Siglec-F, demostró que los eosinófilos poseen un rol en limitar el daño hepático inducido por el parásito. Además, los eosinófilos parecen tener un papel en la inmunidad celular y humoral, ya que su depleción se asocia a un aumento en la expresión de IL-10 en los linfocitos T y un incremento en los títulos de anticuerpos específicos IgG e IgG1.

En conclusión, en este trabajo se caracterizaron a los eosinófilos provenientes de animales infectados por *F. hepatica*, y se comprobó que dichas células, además de sus clásicas funciones efectoras, también ejercen inmunomodulación en la infección por *F. hepatica*, alterando la inmunidad celular tanto como la humoral. Por lo tanto, nuestro trabajo aporta conocimiento a los mecanismos celulares que median la inmunidad contra *F. hepatica*. Sin embargo, otros mecanismos específicos mediante los cuales el eosinófilo estaría ejerciendo regulación sobre el sistema inmune quedan por dilucidarse.

6- Bibliografía

- 1) Maizels, MR., et al., Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. *Immunity*, 2018. 49(5):801-818.
- 2) Hotez, P.J., et al., Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest*, 2008. 118(4): 131.
- 3) Moreau, E., et al., Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J Biomed Biotechnol*, 2010. 2010:428593.
- 4) Motran C., et al., Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells. *Front Immunol*, 2018. 9:664.
- 5) Brooker, S., et al., Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: adding up the numbers – a review. *Int J Parasitol*, 2010. 40(10):1137-44.
- 6) Hotez, P.J., et al. Incorporating a rapid impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med*, 2006. 3:e102.
- 7) Piedrafita, D, et al., Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasite Immunology*, 2010. 32(8): 572.
- 8) Mas-Coma S, et al., Adaptation capacities of *Fasciola hepatica* and their relationships with human fasciolosis: from below sea level up to the very high altitude. *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites*, 2003. 81-123.
- 9) Spithill, T, et al., *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. *Fasciolosis*, 1999. 465-525.
- 10) Cwiklinski, K., et al., A prospective view of animal and human fasciolosis. *Parasite Immunol*, 2016. 38(9): 558-68.
- 11) Carmona, C., et al., Fasciolosis in South America: epidemiology and control challenges. *J Helminthol*, 2017. 91(2): 99-109.
- 12) Keiser, J., et al., Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005. 14(12): p. 1513-26.
- 13) López Lemes, M., et al., Fascioliasis en la República Oriental del Uruguay. *Rev Med Uruguay* 1996. 12: 37-43.

- 14) César, D., Fasciolosis en Bovinos y Ovinos. 109: 48-51.
- 15) Sanchís, J., et al., Seroprevalencia de la fasciolosis bovina en el departamento de Salto (Uruguay). Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología, 2011. 70: 163-171.
- 16) Lammas, DA., et al., The shedding of the outer glycocalyx of juvenile *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol, 1983. 12: 165-178.
- 17) Boray, J.C., Experimental Fascioliasis in Australia, in Adv Parasitol, D. Ben, Editor 1969, Academic Press. 95-210.
- 18) Moazeni, M., et al., Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. Experimental Parasitology, 2016.
- 19) Coles, G.C., Anthelmintic resistance--looking to the future: a UK perspective. Res Vet Sci, 2005. 78(2): 99-100.
- 20) Dalton, J.P., et al., Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development, 2013. 195(3-4): 272-285.
- 21) Fainboim, L.G., Geffner, J., La respuesta inmunitaria: Conceptos Introductorios en "Introducción a la inmunología humana", 6ta Edición, 2011.
- 22) Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S., Inmunidad Innata en "Inmunología Celular y Molecular", 6ta Edición, 2008: 19-46.
- 23) Zelensky, A.N., et al., The C-type lectin-like domain superfamily. FEBS J, 2005. 272(24): 6179-217.
- 24) Sancho, D., et al., Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. Annu Rev Immunol, 2012. 30: 491-529.
- 25) Neefjes, J., et al., Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nat Rev Immunol, 2011. 11(12): 823-836.
- 26) Murphy, K.T., Walport, M., Inmunidad mediada por células T en "Inmunobiología de Janeway". 7ma Edición, 2009: 323-377.
- 27) Zhu, J., et al., T helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019. 10: 10.
- 28) Carbó, A., et al., Computational modeling of heterogeneity and function of CD4+ T cells. Front Cell Develop Biol, 2014. 2(31).

- 29) Finlay, C., et al., Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immun Rev*, 2014. 259: 206-230.
- 30) Van Die, I., et al., Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology*, 2010. 20(1): 2-12.
- 31) Makepeace, B.L., et al., Granulocytes in helminth infection – who is calling the shots? *Curr Med Chem*, 2012. 19(10): 1567-86.
- 32) Raadsma H., et al., Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in merino sheep: I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Vet Parasitol*, 2007. 143(3): 275-86.
- 33) Huang, L., et al., Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes. *Trends Parasitol*, 2016. 32(10): 798-807.
- 34) Von Moltke, J., et al., Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*, 2016. 529(7585): 221-5.
- 35) Varyani, F., et al., Helminths in the gastrointestinal tract as modulators of immunity and pathology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017. 312(6): 537-G549.
- 36) Kelly, D.S., et al., IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 125: 73-80.
- 37) Anthony, R.M., et al., Memory Th2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med*, 2006. 12: 955-960.
- 38) McKay, D.M., The therapeutic helminth? *Trends Parasitol*, 2009. 25(3): 109-14.
- 39) Pearson D.J., et al., The influence of the nematode *Symphacia oblevata* on adjuvant arthritis in the rat. *Immunology*, 1975. 29: 391-396.
- 40) La Flamme A.C., et al., Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect Immun*, 2003. 71: 4996-5004.
- 41) Walsh K.P., et al., Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF- β mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *J. Immunol*, 2009. 183: 1577-1586.

- 42) Finlay, C.M., et al., Helminth Products Protect against Autoimmunity via Innate Type 2 Cytokines IL-5 and IL-33, Which Promote Eosinophilia. *J Immunol*, 2016. 196(2): 703-14.
- 43) Gleich, GJ, et al., The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol*, 1986; 39: 177-253.
- 44) Lee, J., et al., Human vs. mouse eosinophils: "that which we call an eosinophil, by any other name would stain as red". *J Allergy Clin Immunol*, 2012. 130(3): 572-584.
- 45) Dvorak, A., et al., Ultrastructural analysis of human eosinophils. *Chem Immunol*, 2000. 76: 1-28.
- 46) Yoshimura, K., et al., Ultrastructural and morphometric analyses of eosinophils from the cerebrospinal fluid of the mouse and guinea-pig infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasite Immunol*, 1988. 10: 411-423.
- 47) Muniz VS., et al., Eosinophil crystalloid granules: structure, function and beyond. *J Leukoc Biol*, 2012. 92(2): 281-288.
- 48) Ravin, K., et al., The eosinophil function. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 2015.
- 49) Kubach, J., et al., Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood*, 2007. 110(5): 1550-1558.
- 50) Melo, R., et al., Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *J Leukoc Biol*, 2018. 104: 85-93.
- 51) Weller, P., et al., Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol*, 2017. 17(12): 746-760.
- 52) Shen, ZJ., et al., The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates the stability of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA in activated eosinophils. *Nat Immunol*, 2005. 6: 1280-1287.
- 53) Chu, VT., et al., Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma survival. *Eur J Immunol*, 2012. 42: 130-137.
- 54) Hogan, SP., et al., Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*, 2008. 38(5): 709-750.
- 55) Rosenberg HF, et al., RNase a ribonucleases and host defense: an evolving story. *J Leukoc Biol*, 2008. 83(5): 1079-1087.

- 56) Bystrom, J., et al., Analysing the eosinophil cationic protein: a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir Res*, 2011. 12:10.
- 57) Rosenberg, HF., et al., Eosinophil-derived neurotoxin. *Methods Enzymol*, 2001. 341: 273-286.
- 58) Cormier, SA., et al., Mouse eosinophil-associated ribonucleases: a unique subfamily expressed during hematopoiesis. *Mammalian Genome*, 2001. 12: 352-61.
- 59) Kita, H., Eosinophils: multifaceted biologic properties and roles in health and disease. *Immunol Rev*, 2011. 242(1): 161-177.
- 60) Iwasaki, H., et al., Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med*, 2005. 201: 1891-7.
- 61) McNagny K., et al., Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J Exp Med*, 2002. 195: F43-7.
- 62) Marichal, T., et al., Homeostatic eosinophils: characteristics and functions. *Front Med*, 2017. 4:101.
- 63) Kopf, M., et al., IL-5 deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*, 1996. 4(1): 15-24.
- 64) Radinger, M., et al., Eosinophil progenitors in allergy and asthma – do they matter? *Pharmacol Ther*, 2009. 121: 174-84.
- 65) Uhm, T., et al., Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2012. 4(2): 68-79.
- 66) Wen, T., et al., The regulatory function of eosinophils. *Microbiol Spectr*, 2016. 4(5).
- 67) Nagase, H. et al., Expression and function of toll-like receptors in eosinophils: activation by toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol*, 2003. 171: 3977-3982.
- 68) Guilbert, TW., et al., Role of infection in the development and exacerbation of asthma. *Expert Rev Respir Med*, 2010. 4:71-83.
- 69) Bedoya, VI., et al., Ribonucleases in HIV type 1 inhibition: effect of recombinant RNases on infection of primary T cells and immune activation-induced RNase gene and protein expression. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006. 22: 897-907.

- 70) Soukup, JM., et al., Role of monocytes and eosinophils in human respiratory syncytial virus infection in vitro. *Clin Immunol*, 2003. 107: 178-185.
- 71) Long, H., et al., A player and coordinator: the versatile roles of eosinophils in the immune system. *Transfus Med Hemother*, 2016. 43: 96-108.
- 72) Neves, JS., et al., Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. *Curr Opin Immunol*, 2009. 21: 694-699.
- 73) Verjan García, N., et al., Sirp α /CD172a regulates eosinophil homeostasis. *J Immunol*, 2011. 187: 2268-2277.
- 74) Ohkawara, Y., et al., CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest*, 1996. 97: 1761-1766.
- 75) Lee, JJ., et al., Eosinophils in health and disease: the liar hypothesis. *Clin Exp Allergy*, 2010. 40(4): 563-75.
- 76) Rao, S., et al., Regulation of eosinophil recruitment and activation by galectins in allergic asthma. *Front Med*, 2017. 4:68.
- 77) Lingblom, C., et al., Regulatory eosinophils suppress T cells partly through galectin-10. *J Immunol*, 2017. 198(12): 4672-4681.
- 78) Borchers, MT., et al., In vitro assessment of chemokine receptor-ligand interactions mediating mouse eosinophil migration. *J Leukoc Biol*, 2002. 71: 1033-41.
- 79) Su, Y., et al., Dual proinflammatory and antiviral properties of pulmonary eosinophils in respiratory syncytial virus vaccine-enhanced disease. *J Virol*, 2015. 89: 1564-1578.
- 80) Wang, L., et al., Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory response. *Nat Immunol*, 2005. 6:902.
- 81) Zuberi, RI., et al., Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol*, 2004. 165: 2045-53.
- 82) Huvneers, S., et al., Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*, 2009. 122: 1059-69.
- 83) Sceppek, S., et al., Compound exocytosis and cumulative degranulation by eosinophils and their role in parasite killing. *Parasitol Today*, 1994. 10: 276-278.

- 84) Persson, C., et al., Primary lysis of eosinophils as a major mode of activation of eosinophils in human diseased tissues. *Nat Rev Immunol*, 2013. 13:902.
- 85) Ueki, S., et al., Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood*, 2013. 121: 2074-2083.
- 86) Erjefalt, JS., et al., New aspects of degranulation and fates of airway mucosal eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161: 2074-2085.
- 87) Watanabe, K., et al., Cytolysis of eosinophils in nasal secretions. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2003. 112: 169-173.
- 88) Shamri, R., et al., CCL11 elicits secretion of RNases from mouse eosinophils and their cell-free granules. *FASEB J*, 2012. 26: 2084-2093.
- 89) Neves, JS., et al., Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008. 105: 18478-18483.
- 90) Spencer, LA., et al., Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Front Immunol*, 2014. 5:496.
- 91) Spencer, LA., et al., Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2 and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol*, 2009. 85: 117-123.
- 92) Nagase, H., et al., Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol*, 2003. 171: 3977-3982.
- 93) Drake, M., et al., Human and mouse eosinophils have antiviral activity against parainfluenza virus. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015. 55(3): 387-394.
- 94) Bianchi, ME., et al., DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, 2007. 81: 1-5.
- 95) Kobayashi, T., et al., Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *J Immunol*, 2010. 184: 6350-6358.
- 96) Abu-Ghazaleh RI., et al., IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol*, 1989. 142: 2393-2400.
- 97) Behm, CA., et al., The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol Today*, 2000. 16:5.

- 98) Truong, MJ., et al., IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur J Immunol*, 1993. 23: 3230-3235.
- 99) Han, S., et al., IL-5 induces suspended eosinophils to undergo unique global reorganization associated with priming. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014. 50(3): 654-664.
- 100) Hansel, TT., et al., Induction and function of eosinophil intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR. *J Immunol*, 1992. 149: 2130-2136.
- 101) Hartnell, A., et al., Interleukin-3-induced up-regulation of CR3 expression on human eosinophils is inhibited by dexamethasone. *Immunology*, 1992. 77: 488-493.
- 102) Mukherjee, M., et al., Eosinophil extracellular traps and inflammatory pathologies – untangling the web!. *Front Immunol*, 2018. 9:2763.
- 103) Bandeira-Melo, C., et al., Cysteinyl leukotrienes induce IL-4 release from cord blood-derived human eosinophils.
- 104) O'Donnell, MC., et al., Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *J Exp Med*, 1983. 157: 1981-1991.
- 105) Shamri, R., et al., Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res*, 2011. 343: 57-83.
- 106) Chu, D., et al., Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. *J Exp Med*, 2014. 211(8): 1657-1672.
- 107) Wong, T., et al., Eosinophils regulate peripheral B cell numbers in both mice and humans. *J Immunol*, 2014. 192: 3548-3558.
- 108) Berek, C., et al., Eosinophils: important players in humoral immunity. *Clin Exp Immunol*, 2016. 183: 57-64.
- 109) Padigel, UM., et al., Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect Immun*, 2006. 74(6): 3232-8.
- 110) Sabin, EA., et al., Early IL-4 production by non-CD4+ cells at the site of antigen deposition predicts the development of a T helper 2 cell response to *Schistosoma mansoni* eggs. *J Immunol*, 1995. 155: 4844-4853.

- 111) Harfi, I., et al., Eosinophils affect functions of in vitro-activated human CD3-CD4+ T cells. *J Transl Med*, 2013. 11:112.
- 112) Sugawara, R., et al., Small intestinal eosinophils regulate Th17 cells by producing IL-1 receptor antagonist. *J Exp Med*, 2016. 213: 555-567.
- 113) Strandmark, J., et al., Eosinophils are required to suppress Th2 responses in Peyer's patches during intestinal infection by nematodes. *Mucosal Immunol*, 2017. 10: 661-672.
- 114) Goldmann, O., et al., Identification of a novel subset of myeloid-derived suppressor cells during chronic staphylococcal infection that resembles immature eosinophils. *J Infect Dis*, 2017. 216(11): 1444-1451.
- 115) Arnold, I., et al., Eosinophils suppress Th1 responses and restrict bacterially induced gastrointestinal inflammation. *J Exp Med*, 2018. 215(8): 2055-2072.
- 116) Chu, VT., et al., Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*, 2011. 12: 151-159.
- 117) Jung, Y., et al., IL-1beta in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production. *Mucosal Immunol*, 2015. 8(4): 930-42.
- 118) Chen, HH., et al., Eosinophils from murine lamina propria induce differentiation of naïve T cells into regulatory T cells via TGF-beta1 and retinoic acid. *Plos One*, 2015. 10(11).
- 119) Throsby, M., et al., CD11c+ eosinophils in the murine thymus: developmental regulation and recruitment upon MHC class I-restricted thymocyte deletion. *J Immunol*, 2000. 165(4): 1965-75.
- 120) Kim, HJ., et al., Selective depletion of eosinophils or neutrophils in mice impacts the efficiency of apoptotic cell clearance in the thymus. *PLoS One*, 2010. 5(7):e11439.
- 121) Gouon-Evans, V., et al., Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. *Breast Cancer Res*, 2002. 4: 155-164.
- 122) Gouon-Evans, V., et al., Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Development*, 2000. 127: 2269-2282.
- 123) Knudsen, UB, et al., Eosinophils in human cervical ripening. *Eur J Obstetr, Gynecol, Reproductive Biol*, 1997. 72: 165-168.

- 124) Timmons, BC., et al., Temporal changes in myeloid cells in the cervix during pregnancy and parturition. *J Immunol*, 2009. 182: 2700-2707.
- 125) Wu, D., et al., Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*, 2011. 332(6026): 243-7.
- 126) Lumeng, CN., et al., Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 2007. 117(1): 175-84.
- 127) Qiu, Y., et al., Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell*, 2014. 157(6):1292-308.
- 128) Molofsky, AB., et al., Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med*, 2013. 210(3): 535-49.
- 129) Klion, AD, et al., The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113: 30-37.
- 130) Buys, J., et al., The killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis* by eosinophil peroxidase in vitro. *Eur J Immunol*, 1981. 11: 843-845.
- 131) Lange, AM., et al., IL-4 and IL-5 dependent protective immunity to *Onchocerca volvulus* infective larvae in BALB/cBYJ mice. *J Immunol*, 1994. 153(1): 205-11.
- 132) Meeusen, E., et al., Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today*, 2000. 16(3): 95-101.
- 133) Akuthota, P., et al., Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin Exp Allergy*, 2008. 38: 1254-1263.
- 134) De Andres, B., et al., Lack of Fcε receptors on murine eosinophils: implications for the functional significance of elevated IgE and eosinophils in parasitic infections. *Blood*, 1997. 89: 3826-3836.
- 135) Shinkai, K., et al., Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature*, 2002. 420: 825-829.
- 136) Berasain, P., et al., *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp Parasitol*, 2000. 94(2): 99-110.

- 137) Hewitson, JP., et al., Concerted activity of IgG1 antibodies and IL-4/IL-25-dependent effector cells trap helminth larvae in the tissues following vaccination with defined secreted antigens, providing sterile immunity to challenge infection. *PLoS Pathogens*, 2015. 11: e1004676.
- 138) Munoz-Caro, T., et al., Leucocyte-derived extracellular trap formation significantly contributes to *Haemonchus contortus* larval entrapment. *Parasites Vectors*, 2015. 8:607.
- 139) O'Connell, AE., et al., Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun*, 2011. 79: 2770-2778.
- 140) Yu, C., et al., Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med*, 2002. 195: 1387-1395.
- 141) Matsuoka, K., et al., Novel basophil- or eosinophil-depleted mouse models for functional analysis of allergic inflammation. *PLoS One*, 2013. 8(4): e60958.
- 142) Knott, ML., et al., Impaired resistance in early secondary *Nippostrongylus brasiliensis* infections in mice with defective eosinophilopoiesis. *Int J Parasitol*, 2007. 37: 1367-1378.
- 143) Taylor, MJ., et al., Lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Lancet*, 2010. 376(9747): 1175-85.
- 144) Simons, JE., et al., Eotaxin-1-regulated eosinophils have a critical role in innate immunity against experimental *Brugia malayi* infection. *Eur J Immunol*, 2005. 35: 189-197.
- 145) Swartz, JM., et al., *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*, 2006. 108(7): 2420-7.
- 146) Inoue, Y., et al., Nonpathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils. *J Immunol*, 2005. 175: 5439-5447.
- 147) Svensson, M., et al., Accumulation of eosinophils in intestine-draining mesenteric lymph nodes occurs after *Trichuris muris* infection. *Parasite Immunol*, 2011. 33: 1-11.
- 148) Bliss, SK., et al., IL-10 prevents liver necrosis during murine infection with *Trichinella spiralis*. *J Immunol*, 2003. 171: 3142-3147.

- 149) Zafra, R., et al., Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *J Comp Pathol*, 2013. 148(4): 373-84.
- 150) Jedlina, L., et al., In vivo studies of the early, peritoneal, cellular and free radical response in rats infected with *Fasciola hepatica* by flow cytometric analysis. *Exp Parasitol*, 2011. 128(3): 291-7.
- 151) Escamilla, A., et al., *Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep. *Vet Parasitol*, 2016. 216: 84-8.
- 152) Serradell, MC., et al., Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Vet Immunol Immunopathol*, 2007. 117(3-4): 197-208.
- 153) Nakayama, T., et al., Th2 cells in health and disease. *Annu Rev Immunol*, 2017. 35: 53-84.
- 154) Van Dyken, SJ., et al., Interleukin-4 and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol*, 2013. 31: 317-343.
- 155) Gieseck, R., et al., Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Immunol*, 2017. 18: 62-76.
- 156) Heymann, F., et al., Immunology in the liver – from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. 13(2): 88-110.
- 157) Caja, L., et al., TGF- β and the tissue microenvironment: relevance in fibrosis and cancer. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(5).
- 158) Reiman, RM., et al., Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun*, 2006. 74: 1471-1479.
- 159) Heredia, JE., et al., Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell*, 2013. 153: 376-388.
- 160) Carasi, P., et al., Heme-oxygenase-1 expression contributes to the immunoregulation induced by *Fasciola hepatica* and promotes infection. *Front Immunol*, 2017. 8:883.
- 161) Noya, V., et al., A mucin-like peptide from *Fasciola hepatica* induces parasite-specific Th1-type cell immunity. *Parasitol Res*, 2016. 115(3): 1053-63.
- 162) Van Milligen, F., et al., Location of induction and expression of protective immunity against *Fasciola hepatica* at the gut level: a study using an ex vivo infection model with ligated gut segments. *J Parasitol*, 1998. 84(4): 771-777.

- 163) Smith, PK., et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985. 150(1): 661-9.
- 164) Rahimi, J., et al., Overview of cerebrospinal fluid cytology. *Neuropathology*, 2018. 145: 563-571.
- 165) Noor, Z., et al., Role of eosinophils and tumor necrosis factor alpha in interleukin-25-mediated protection from amebic colitis. *mBio* 8:e02329-16.
- 166) Lucarini, V., et al., IL-33 restricts tumor growth and inhibits pulmonary metastasis in melanoma-bearing mice through eosinophils. *Oncoimmunology*, 2017. 6(6): e1317420.
- 167) Dyer, KD., et al., Antigen profiles for the quantitative assessment of eosinophils in mouse tissues by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 2011. 369(1-2): 91-7.
- 168) Pelaia, C., et al., Interleukin-5 in the pathophysiology of severe asthma. *Front Physiol*, 2019. 10:1514.
- 169) Ziegler, SF., et al., The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. *Curr Opin Immunol*, 2010. 22: 795-799.
- 170) Ziegler, SF., et al., The biology of thymic stromal lymphopoietin. *Adv Pharmacol*, 2013. 66: 129-155.
- 171) Jose, P., et al., Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med*, 1994. 179: 881-887.
- 172) Stevenson, NJ., et al., CCL11 blocks IL-4 and GM-SCF signaling in hematopoietic cells and hinders dendritic cell differentiation via suppressor of cytokine signaling expression. *J Leukoc Biol*, 2009. 85: 289-297.
- 173) Ali, A., et al., An analysis of trafficking receptors shows that CD44 and P-selectin glycoprotein ligand-1 collectively control the migration of activated human T-cells. *Front Immunol*, 2017. 8: 492.
- 174) Rodríguez, E., et al., *Fasciola hepatica* immune regulates CD11c+ cells by interacting with the macrophage Gal/GalNAc lectin. *Front Immunol*, 2017. 8:264.
- 175) Dyer, KD., et al., Mouse and human eosinophils degranulate in response to platelet-activating factors (PAF) and lysoPAF via a PAF-receptor-independent mechanism: evidence for a novel receptor. *J Immunol*, 2010. 184: 6327-6334.

- 176) Patnode, M., et al., Leukotriene B4 amplifies Eosinophil accumulation in response to nematodes. *J Exp Med*, 2014. 211(7): 1281-1288.
- 177) Cadman, E., ET al., Eosinophils are important for protection, immunoregulation and pathology during infection with nematode microfilariae. *PLoS Pathog*, 2014. 10(3): e1003988.
- 178) Li, S., et al., Eosinophil chemotactic chemokine profilings of the brain from permissive and non-permissive hosts infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res*, 2014. 113: 517-525.
- 179) Dias, F., et al., Identification of piecemeal degranulation and vesicular transport of MBP-1 in liver-infiltrating mouse eosinophils during acute experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Front Immunol*, 2018. 9:3019.
- 180) McMillan, SJ., et al., Siglec-F-dependent negative regulation of allergen-induced eosinophilia depends critically on the experimental model. *Immunol Lett*, 2014. 160(1): 11-16.
- 181) Hellmark, T., et al., Eosinophils in anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis. *BMC Rheumatol*, 2019. 3:9.
- 182) Tachimoto, H., et al., Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophil adhesion and migration. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002. 128: 18-20.
- 183) Morath, I., et al., CD44: more than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016. 81: 166-173.
- 184) Johansson, MW., et al., Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy*, 2014. 44(4): 482-498.
- 185) Rothenberg, M., et al., CD44-a sticky target for asthma. *J Clin Invest*, 2003. 111(10): 1460-1462.
- 186) Kumar, S., et al., Aggravation of allergic airway inflammation by cigarette smoke in mice is CD44-dependent. *PLoS One*, 2016. 11(3): e0151113.
- 187) Moore, KL., Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma*, 1998. 29(1-2): 1-15.
- 188) Andreone, S., et al., IL-33 promotes CD11b/CD18-mediated adhesion of eosinophils to cancer cells and synapse-polarized degranulation leading to tumor cell killing. *Cancers (Basel)*, 2019. 11(11).

- 189) Berek, C., Eosinophils can more than kill. *J Exp Med*, 2018. 215(8): 1967-1969.
- 190) Mawhorter, SD., et al., Human eosinophils as antigen-presenting-cells: relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. *Immunology*, 1994. 81(4): 584-91.
- 191) Schuijs, MJ., et al., Professional and 'amateur' antigen-presenting-cells in type 2 immunity. *Trends Immunol*, 2019. 40(1): 22-34.
- 192) Rodríguez, E., et al., Glycans from *Fasciola hepatica* modulate the host immune response and TLR-induced maturation of dendritic cells. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. 9(12): e0004234.
- 193) Ueki, S., et al., Eosinophil extracellular traps cell death-derived DNA traps: their presence in secretions and functional attributes. *J Allergy Clin Immunol*, 2016. 137(1): 258-267.
- 194) Marx, C., et al., Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis with eosinophil extracellular traps. *Blood*, 2019. 134(21): 1859-1872.
- 195) David, JR., et al., Immunity to *Schistosoma mansoni*: antibody-dependent eosinophil-mediated damage to schistosomula. *Fed Proc*, 1977. 36: 2176-2180.
- 196) Hagan, P., et al., In-vitro antibody-dependent killing of schistosomula of *Schistosoma haematobium* by human eosinophils. *Parasite Immunol*, 1985. 7: 617-624.
- 197) Rotman, HL., et al., *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. *Exp Parasitol*, 1996. 82(3): 267-78.
- 198) Van Milligen, FJ., et al., Protection of *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunol*, 1998. 20(6): 285-92.
- 199) Rodríguez, E., et al., *Fasciola hepatica* glycoconjugates immunoregulate dendritic cells through the dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin inducing T cell anergy. *Sci Rep*, 2017. 7:46748.
- 200) Strandmark, J., et al., Eosinophils in homeostasis and their contrasting roles during inflammation and helminth infections. *Crit Rev Immunol*, 2016. 36(3): 193-238.

- 201) Ramalho-Pinto, FJ., et al., Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils in vitro. *J Exp Med*, 1978. 147: 147-56.
- 202) Shin, EH., et al., Involvement of complement and fibronectin in eosinophil-mediated damage to *Nippostrongylus brasiliensis* larva. *Parasite Immunol*, 2001. 23: 27-37.
- 203) Kazura, JW., et al., Stage-specific antibody-dependent eosinophil-mediated destruction of *Trichinella spiralis*. *Nature*, 1978. 274: 588-9.
- 204) Sher, A., et al., Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J Immunol*, 1990. 145: 3911-3916.
- 205) Dent, LA., et al., Eosinophilic interleukin 5 (IL-5) transgenic mice: eosinophil activity and impaired clearance of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol*, 1997. 19: 291-300.
- 206) Huang, L., et al., Eosinophil-derived IL-10 supports chronic nematode infection. *J Immunol*, 2014. 193: 4178-87.
- 207) Knott, ML., et al., The roles of eotaxin and the STAT6 signalling pathway in eosinophil recruitment and host resistance to the nematodes *Nippostrongylus brasiliensis* and *Heligmosomoides bakeri*. *Mol Immunol*, 2009. 46: 2714-22.
- 208) Cadman, ET., et al., Eosinophils are important for protection, immunoregulation and pathology during infection with nematode microfilariae. *PLoS Pathog*, 2014. 10:e1003988.
- 209) Van Milligen, FJ., et al., Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunol*, 1999. 21(5): 243-51.
- 210) Hrcckova, G., et al., Dynamics of hepatic stellate cells, collagen types I and III synthesis and gene expression of selected cytokines during hepatic fibrogenesis following *Mesocestoides vogae* (Cestoda) infection in mice. *Int J Parasitol*, 2010. 40: 163-174.
- 211) Mazur-Melewska, K., et al., Production of interleukins 4 and 10 in children with hepatic involvement in the course of *Toxocara* spp infection. *Parasite Immunol*, 2016. 38: 101-107.
- 212) Rood, JE., et al., IL-10 distinguishes a unique population of activated, effector-like CD8+ T cells in murine acute liver inflammation. *J Leukoc Biol*, 2017. 101(4): 1037-1044.

- 213) Gleich, GJ., et al., The consequences of not having eosinophils. *Allergy*, 2013. 68(7): 829-35.

7 - Anexo

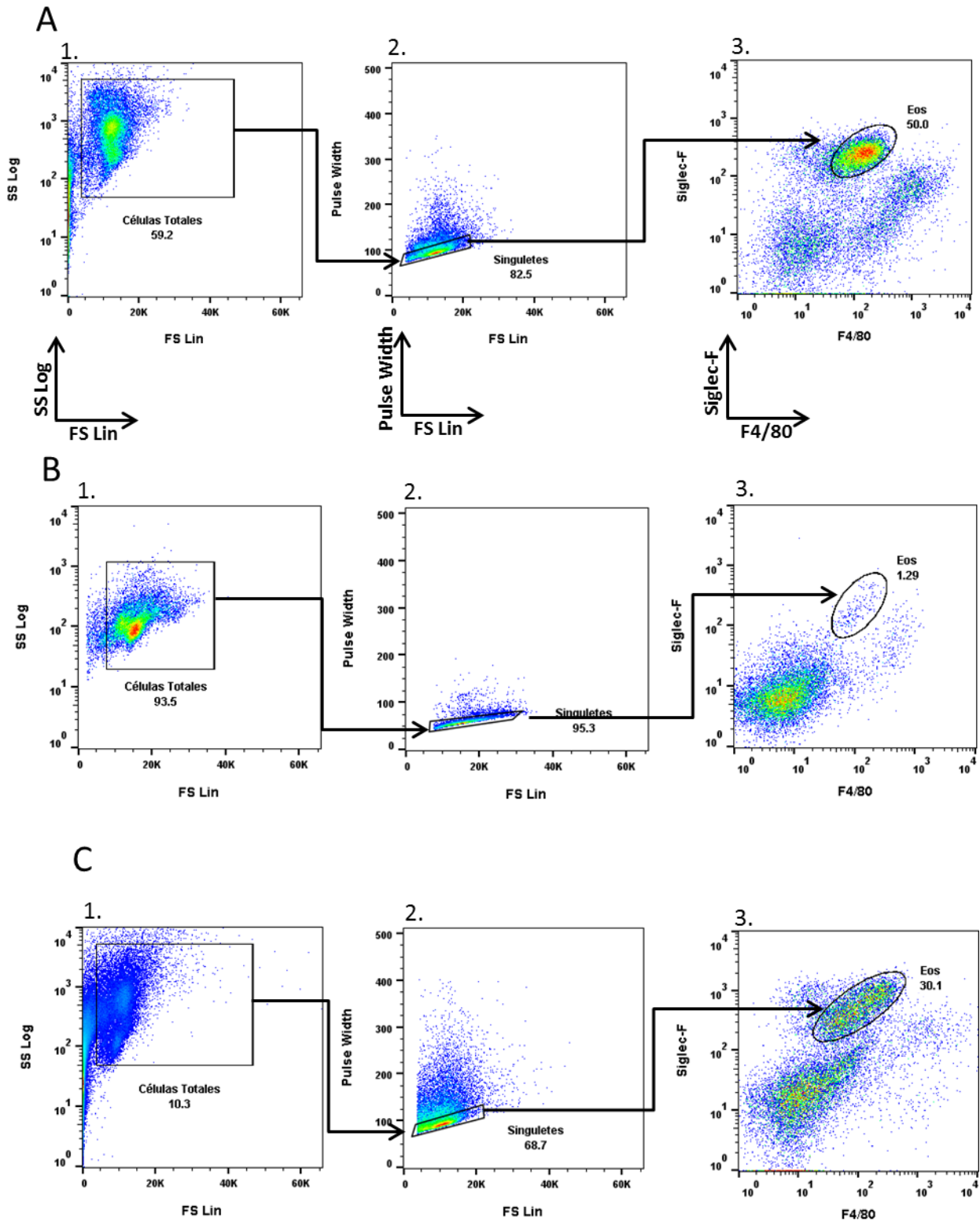


Figura 7.1. Estrategia de gating utilizada para definir eosinófilos en los ensayos de identificación de eosinófilos hacia la cavidad peritoneal, bazo e hígado en animales infectados por *F. hepatica* (Figura 3.1). Se muestra la estrategia de gating utilizada para identificar eosinófilos en cavidad peritoneal (A) bazo (B) e hígado (C) de animales infectados por *F. hepatica*. En (1) se excluyen los debrís celulares. En (2) se excluyen los dobletes. En (3) se definen los eosinófilos. Los gráficos corresponden a un único experimento.

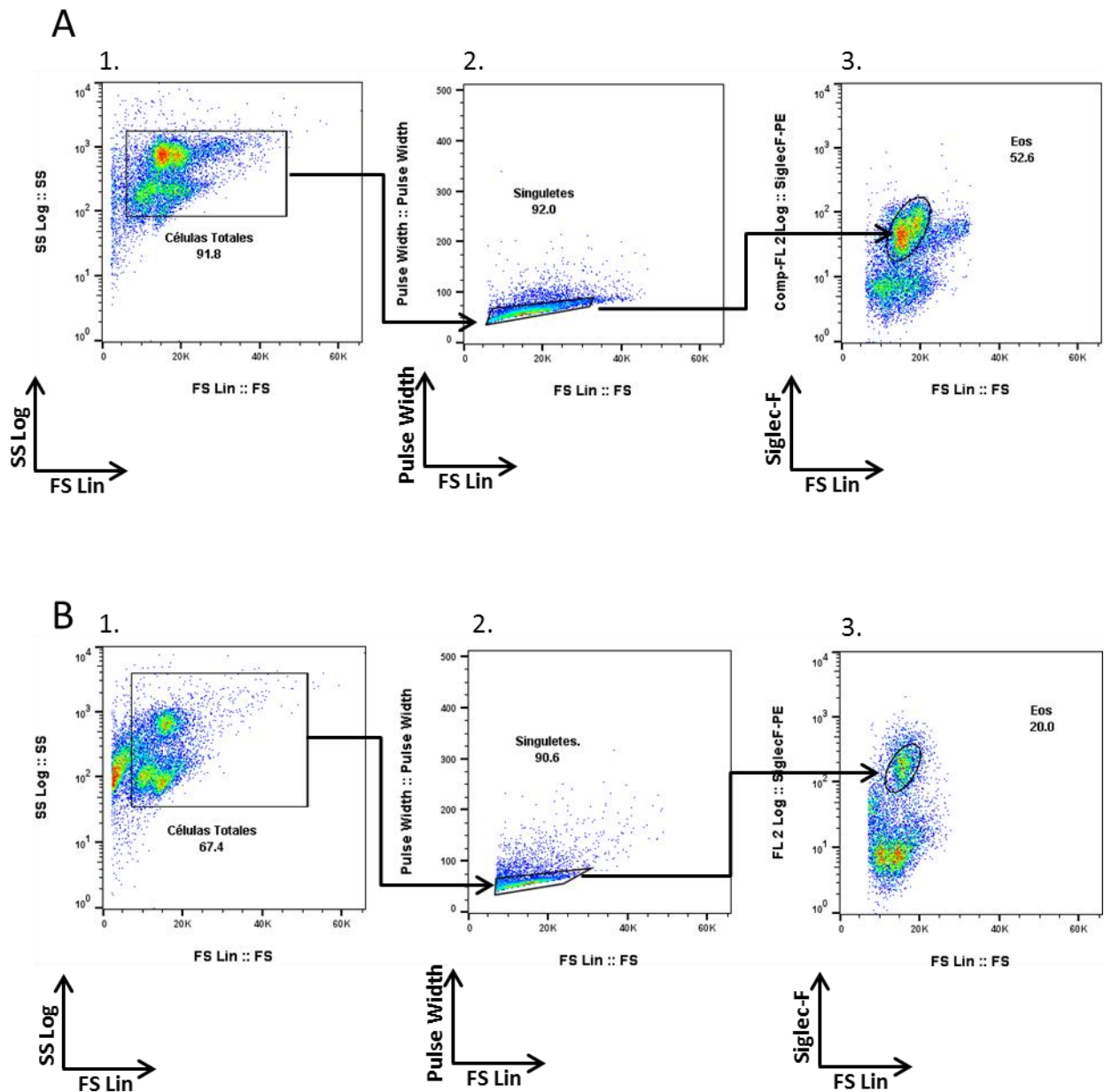


Figura 7.2. Estrategia de gating utilizada para definir eosinófilos en los ensayos de reclutamiento de eosinófilos hacia el hígado y cavidad peritoneal en animales infectados por *F. hepatica* (Figura 3.6). Se muestra la estrategia de gating utilizada para definir eosinófilos en cavidad peritoneal (A) e hígado (B) de animales infectados por *F. hepatica*. En (1) se excluyen los debrís celulares. En (2) se excluyen los dobletes. En (3) se definen los eosinófilos. Los gráficos corresponden a un único experimento.

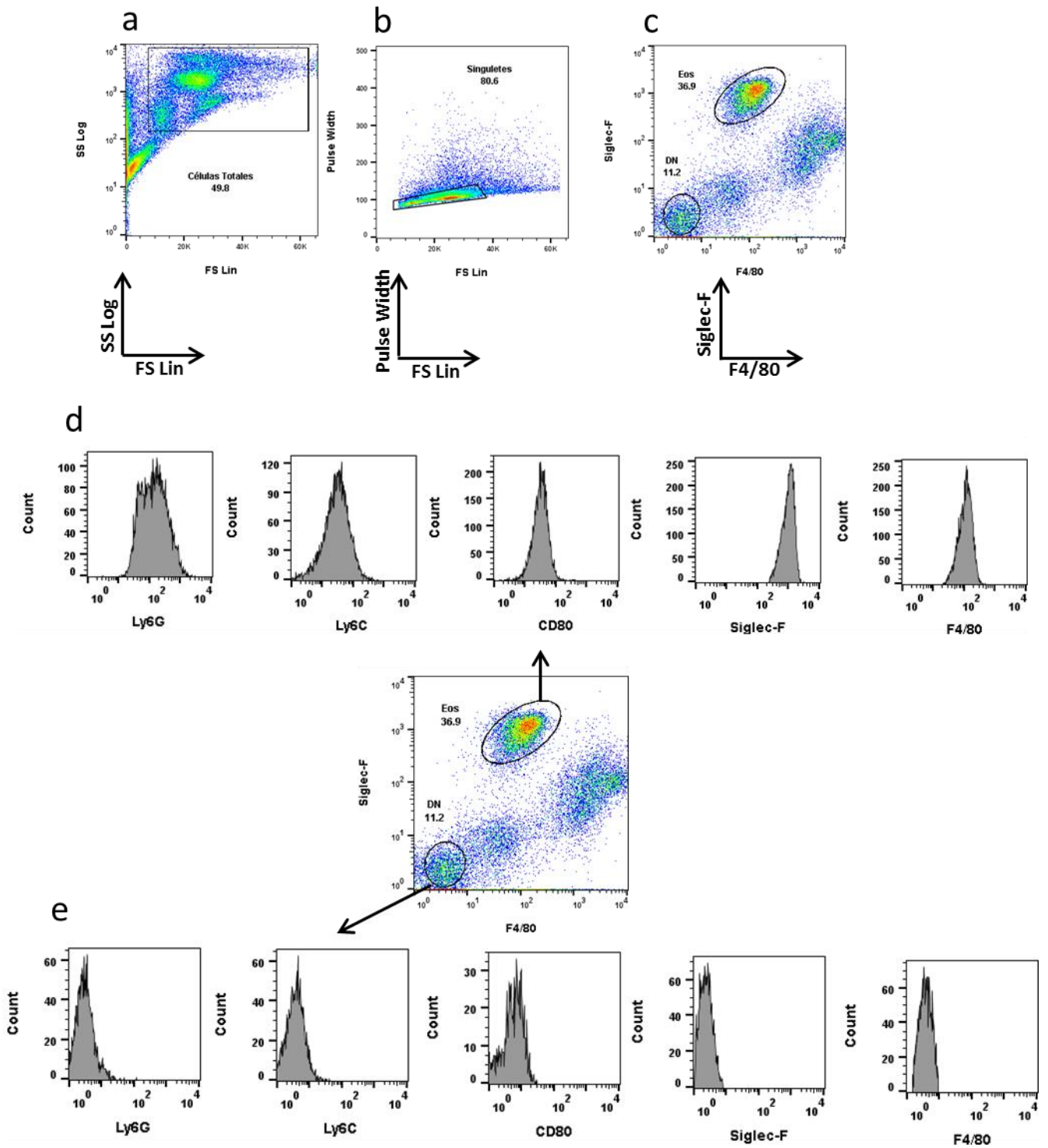


Figura 7.3. Expresión de las moléculas Ly6G, Ly6C, CD80, Siglec-F y F4/80 en eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados por *F. hepatica*. Se muestra la estrategia de gating utilizada para determinar la expresión de las moléculas Ly6G, Ly6C, CD80, Siglec-F y F4/80 en eosinófilos de la cavidad peritoneal. Se descartaron los debris (a), se seleccionaron los singletes (b) y se seleccionó la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ F4/80^{int} (c). Se analizó la expresión de las nombradas moléculas en eosinófilos(d) Se utilizó la población doble negativa (DN) para el control (e). Se muestran resultados representativos de un animal de n=4.

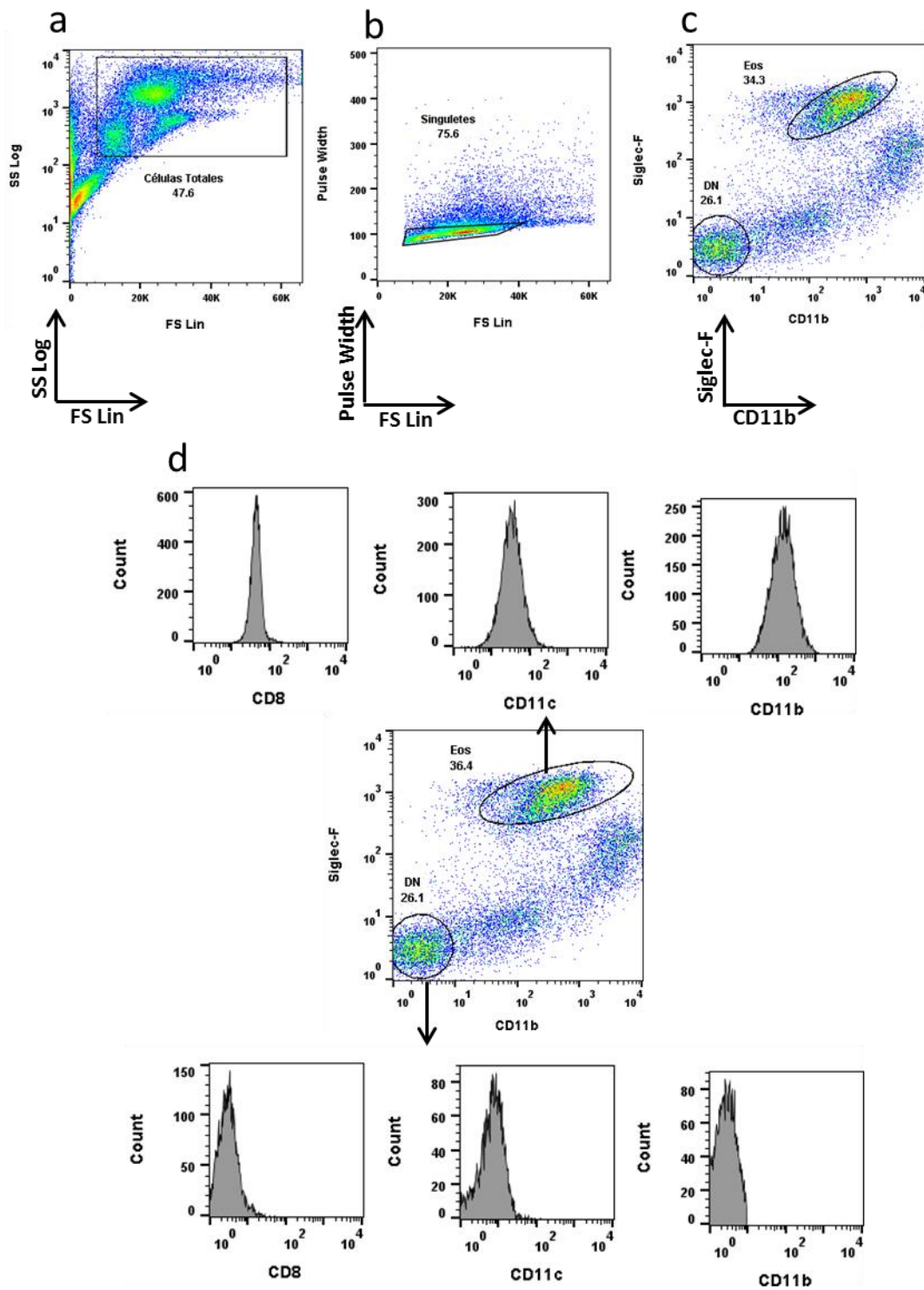


Figura 7.4. Expresión de las moléculas CD8, CD11c y CD11b en eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados por *F. hepatica*. Se muestra la estrategia de gating utilizada para determinar la expresión de las moléculas CD8, CD11c y CD11b en eosinófilos de la cavidad peritoneal. Se descartaron los debris (a), se seleccionaron los singuletes (b) y se seleccionó la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ CD11b⁺ (c). Se analizó la expresión de las nombradas moléculas en eosinófilos (d). Se utilizó la población doble negativa (DN) para el control (e). Se muestran resultados representativos de un animal de n=4.

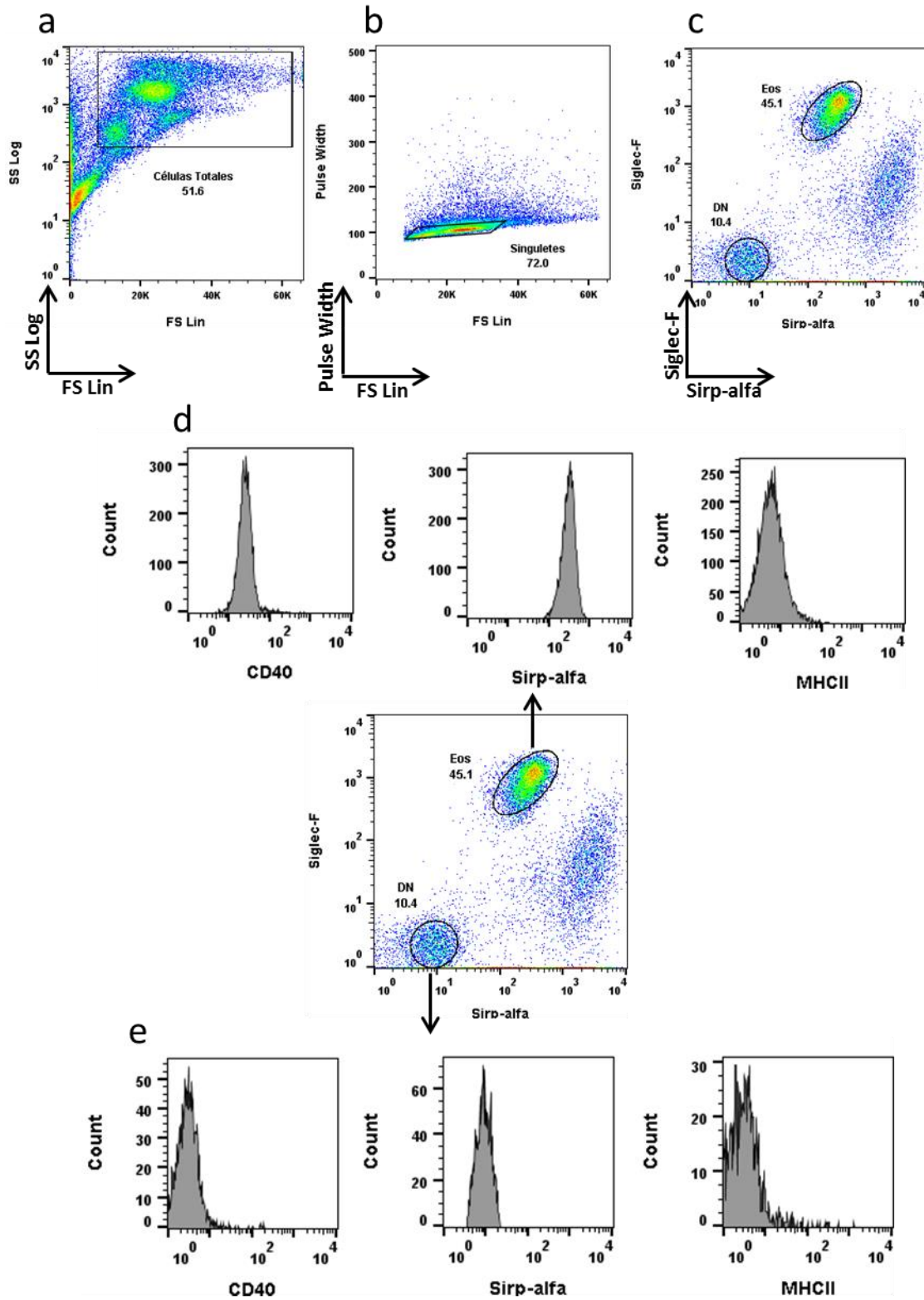


Figura 7.5. Expresión de las moléculas CD40, Sirp-alfa y MHCII en eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados por *F. hepatica*. Se muestra la estrategia de gating utilizada para determinar la expresión de las moléculas CD40, Sirp-alfa y MHCII en eosinófilos de la cavidad peritoneal. Se descartaron los debris (a), se seleccionaron los singuletes (b) y se seleccionó la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ CD11b⁻ (c). Se analizó la expresión de las nombradas moléculas en eosinófilos (d). Se utilizó la población doble negativa (DN) para el control (e). Se muestran resultados representativos de un animal de n=4.

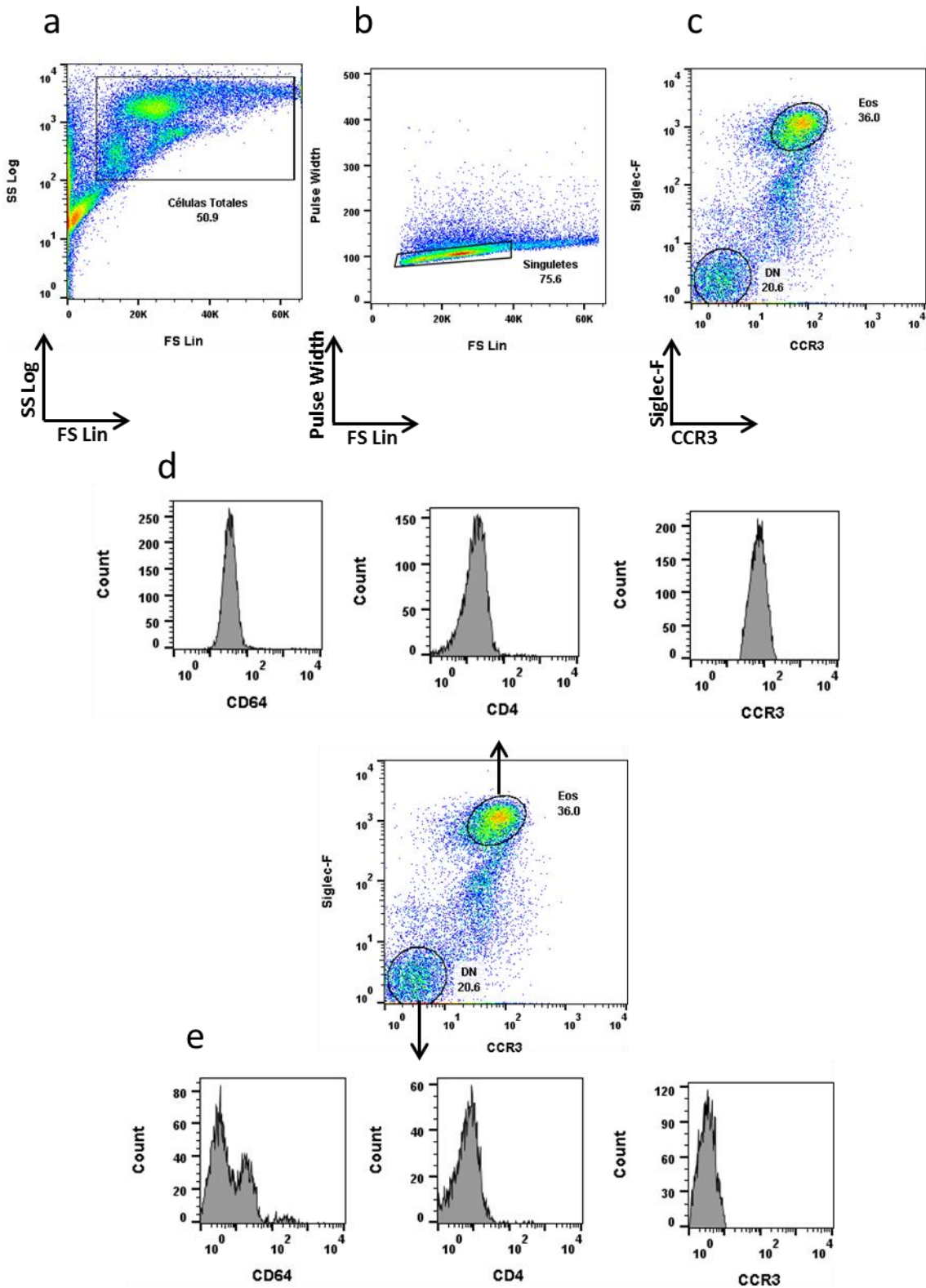


Figura 7.6. Expresión de las moléculas CD64, CD4 y CCR3 en eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados por *F. hepatica*. Se muestra la estrategia de gating utilizada para determinar la expresión de las moléculas CD64, CD4 y CCR3 en eosinófilos de la cavidad peritoneal. Se descartaron los debris (a), se seleccionaron los singuletes (b) y se seleccionó la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ CCR3⁺ (c). Se analizó la expresión de las nombradas moléculas en eosinófilos (d). Se utilizó la población doble negativa (DN) para el control (e). Se muestran resultados representativos de un animal de n=4.

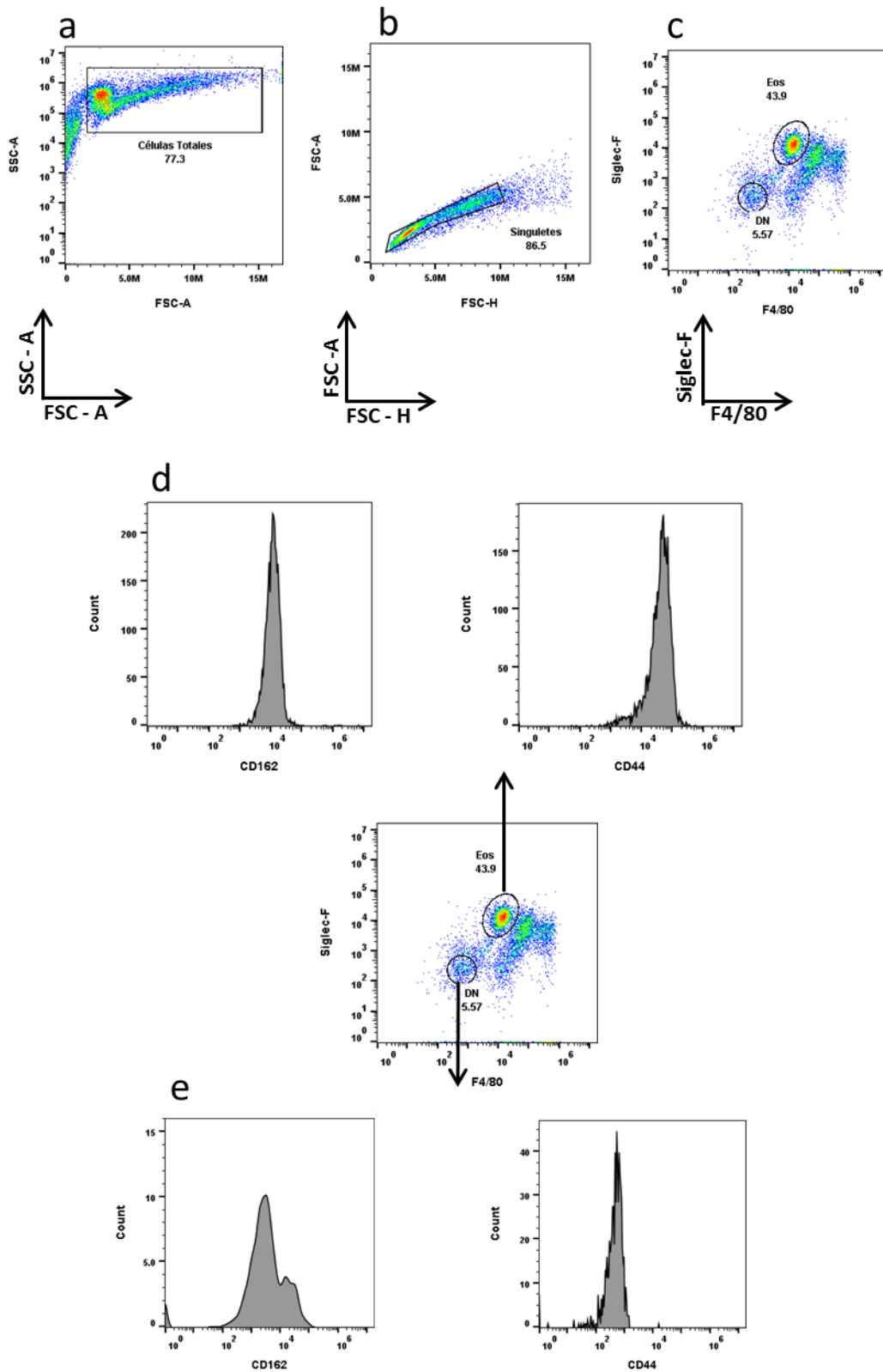


Figura 7.7. Expresión de las moléculas CD162 y CD44 en eosinófilos de la cavidad peritoneal de animales infectados por *F. hepatica*. Se muestra la estrategia de gating utilizada para determinar la expresión de las moléculas CD162 y CD44 en eosinófilos de la cavidad peritoneal. Se descartaron los debrís (a), se seleccionaron los singuletes (b) y se seleccionó la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ F4/80^{int} (c). Se analizó la expresión de las nombradas moléculas en eosinófilos (d). Se utilizó la población doble negativa (DN) para el control (e). Se muestran resultados representativos de un animal de n=3.

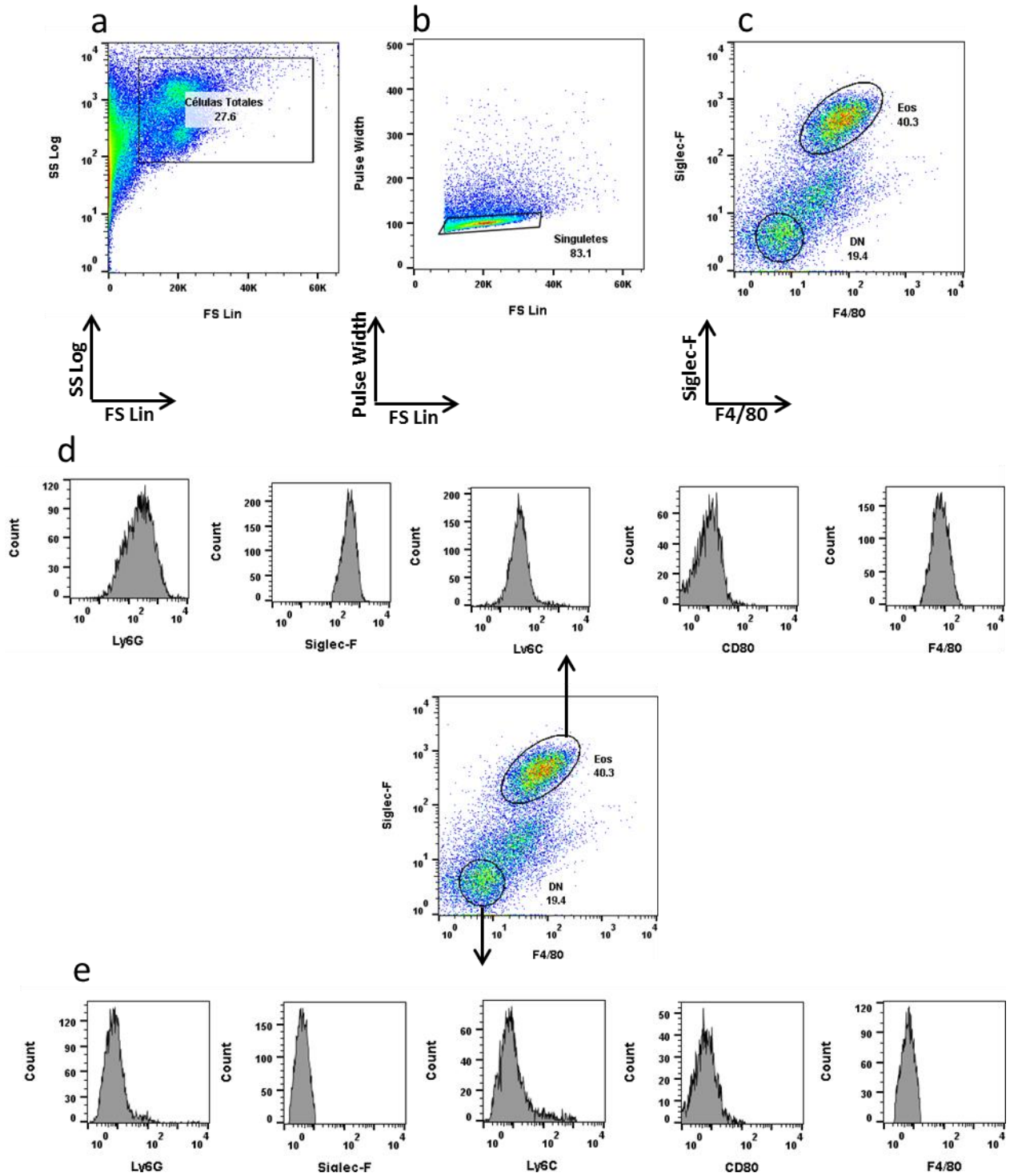


Figura 7.8. Expresión de las moléculas Ly6G, Siglec-F, Ly6C, CD80 y F4/80 en eosinófilos del hígado de animales infectados por *F. hepatica*. Se muestra la estrategia de gating utilizada para determinar la expresión de las moléculas Ly6G, Siglec-F, Ly6C, CD80 y F4/80 en eosinófilos hepáticos. Se descartaron los debris (a), se seleccionaron los singuletes (b) y se seleccionó la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ F4/80^{int} (c). Se analizó la expresión de las nombradas moléculas en eosinófilos (d). Se utilizó la población doble negativa (DN) para el control (e). Se muestran resultados representativos de un animal de n=5.

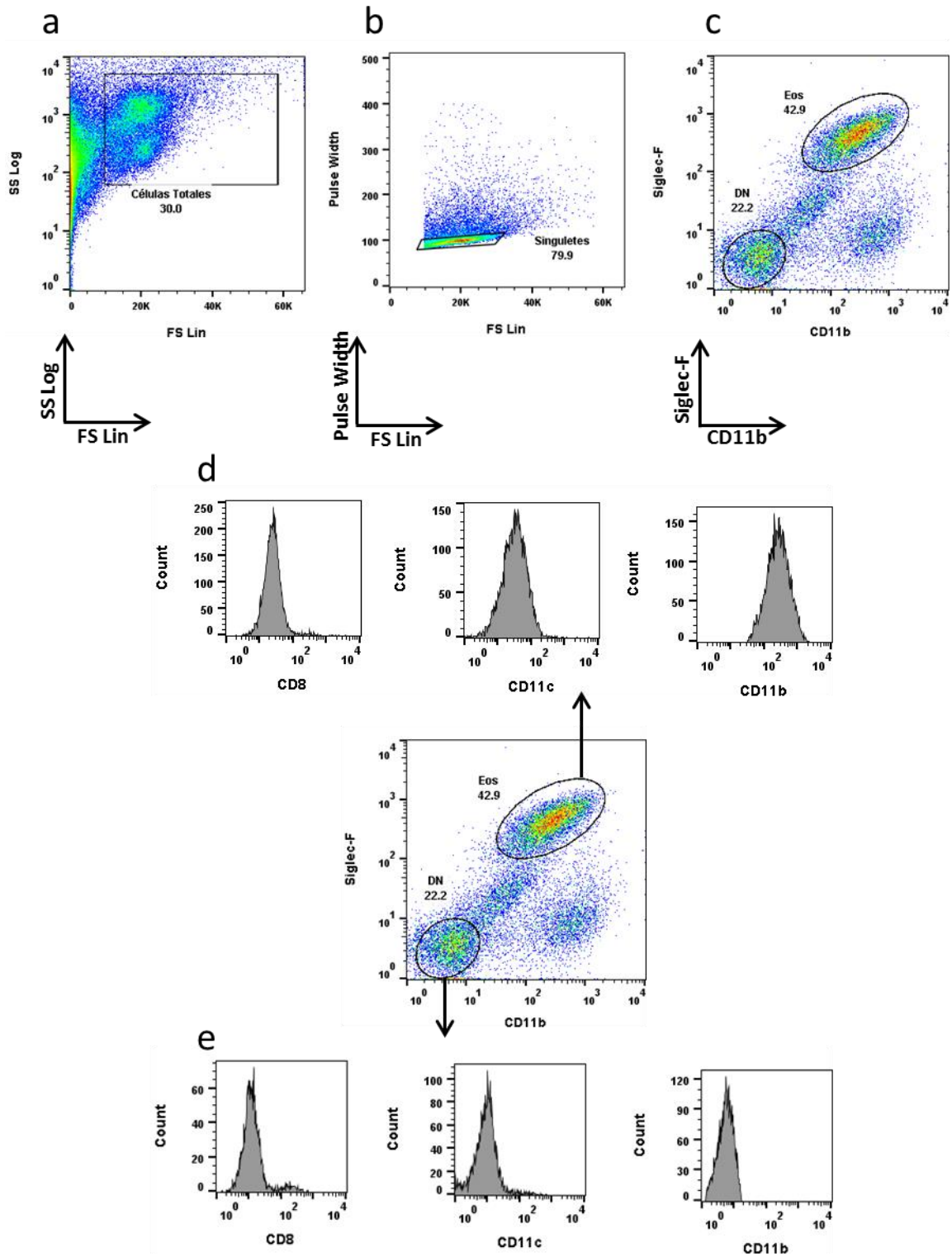


Figura 7.9. Expresión de las moléculas CD8, CD11c y CD11b en eosinófilos del hígado de animales infectados por *F. hepatica*. Se muestra la estrategia de gating utilizada para determinar la expresión de las moléculas CD8, CD11c y CD11b en eosinófilos hepáticos. Se descartaron los debris (a), se seleccionaron los singuletes (b) y se seleccionó la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ CD11b⁺ (c). Se analizó la expresión de las nombradas moléculas en eosinófilos (d). Se utilizó la población doble negativa (DN) para el control (e). Se muestran resultados representativos de un animal de n=5.

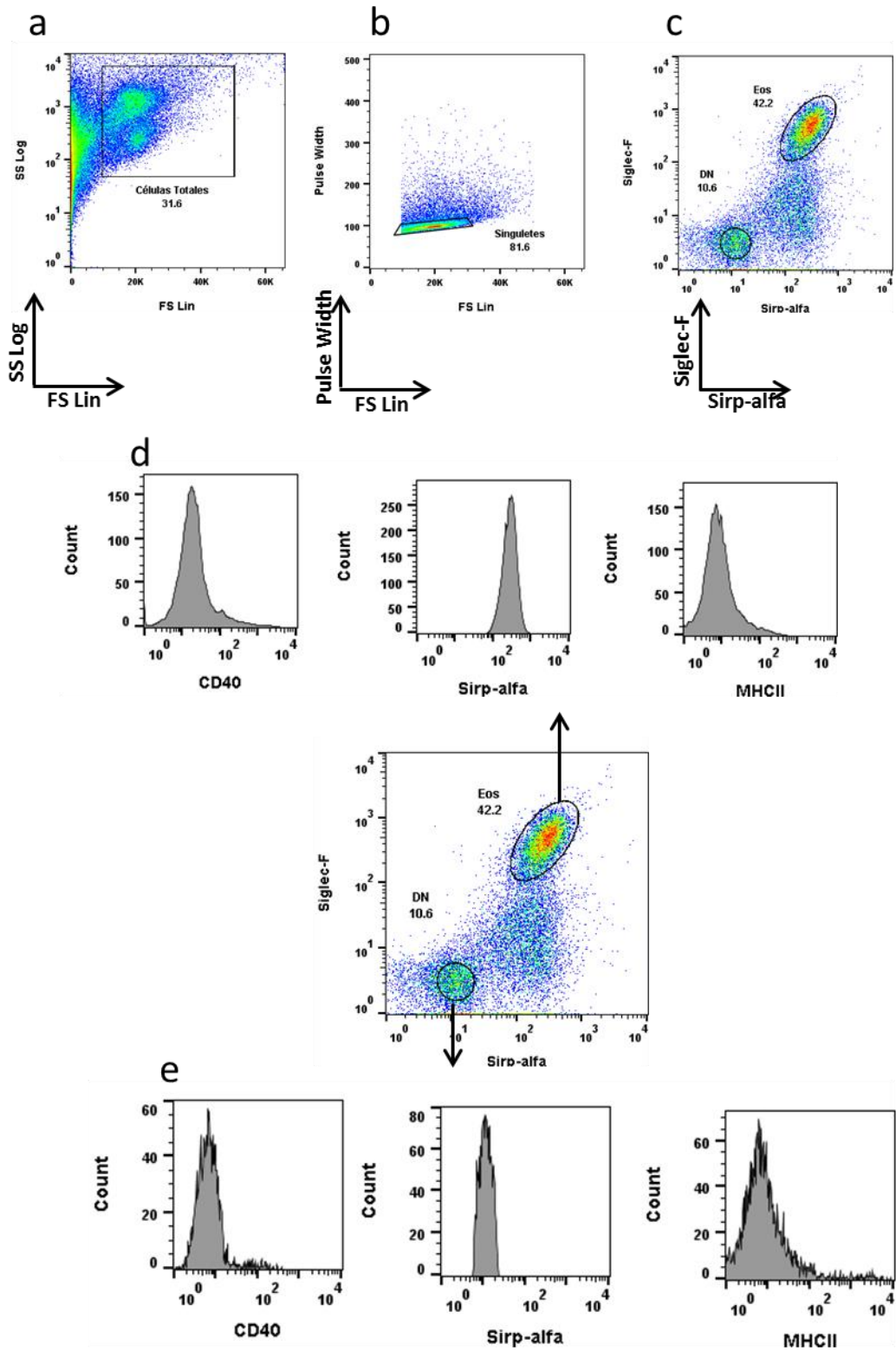


Figura 7.10. Expresión de las moléculas CD40, Sirp-alfa y MHCII en eosinófilos del hígado de animales infectados por *F. hepatica*. Se muestra la estrategia de gating utilizada para determinar la expresión de las moléculas CD40, Sirp-alfa y MHCII en eosinófilos hepáticos. Se descartaron los debris (a), se seleccionaron los singuletes (b) y se seleccionó la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ Sirp-alfa⁺ (c). Se analizó la expresión de las nombradas moléculas en eosinófilos (d). Se utilizó la población doble negativa (DN) para el control (e). Se muestran resultados representativos de un animal de n=5.

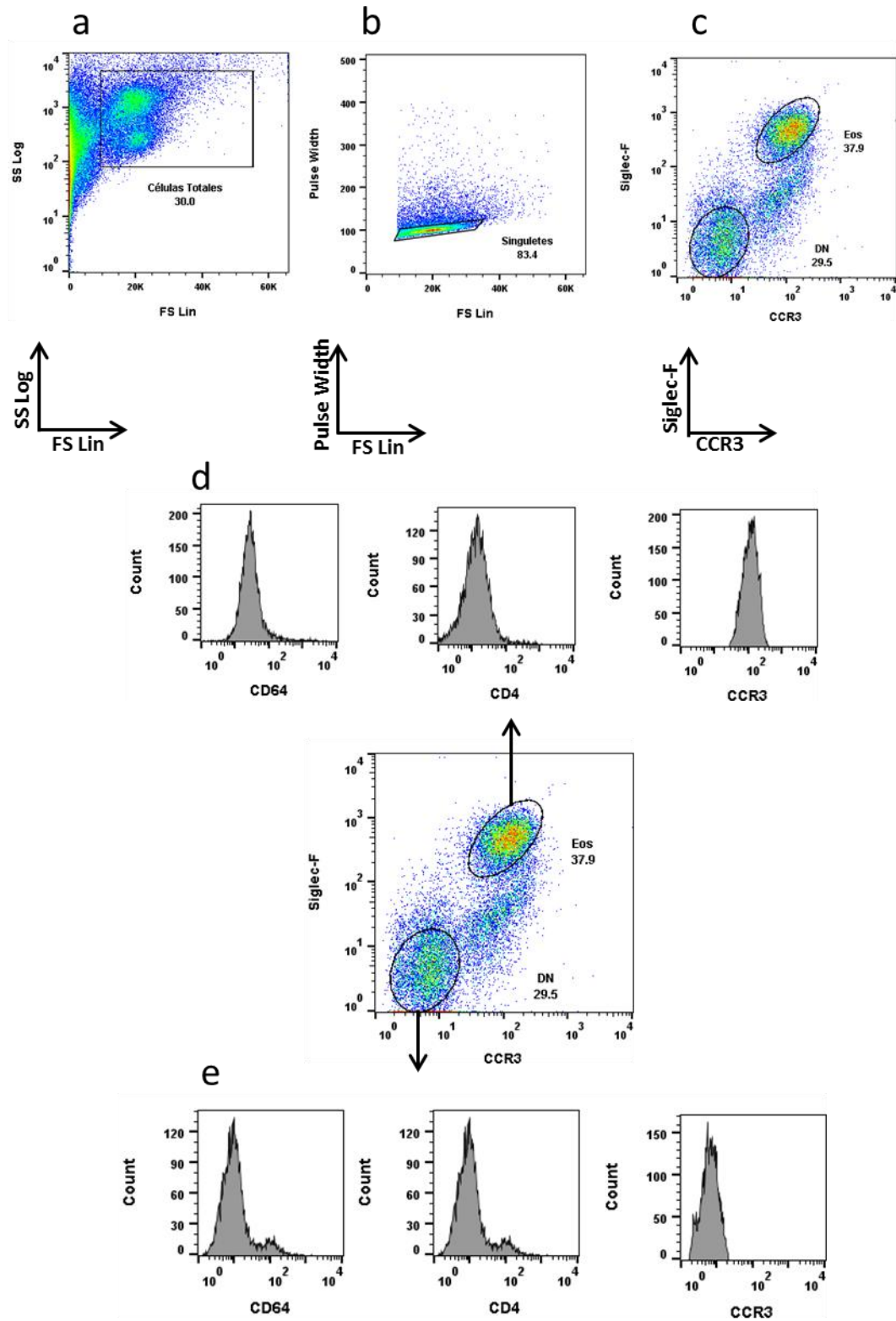


Figura 7.11. Expresión de las moléculas CD64, CD4 y CCR3 en eosinófilos del hígado de animales infectados por *F. hepatica*. Se muestra la estrategia de gating utilizada para determinar la expresión de las moléculas CD64, CD4 y CCR3 en eosinófilos hepáticos. Se descartaron los debris (a), se seleccionaron los singuletes (b) y se seleccionó la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ CCR3⁺ (c). Se analizó la expresión de las nombradas moléculas en eosinófilos (d). Se utilizó la población doble negativa (DN) para el control (e). Se muestran resultados representativos de un animal de n=5.

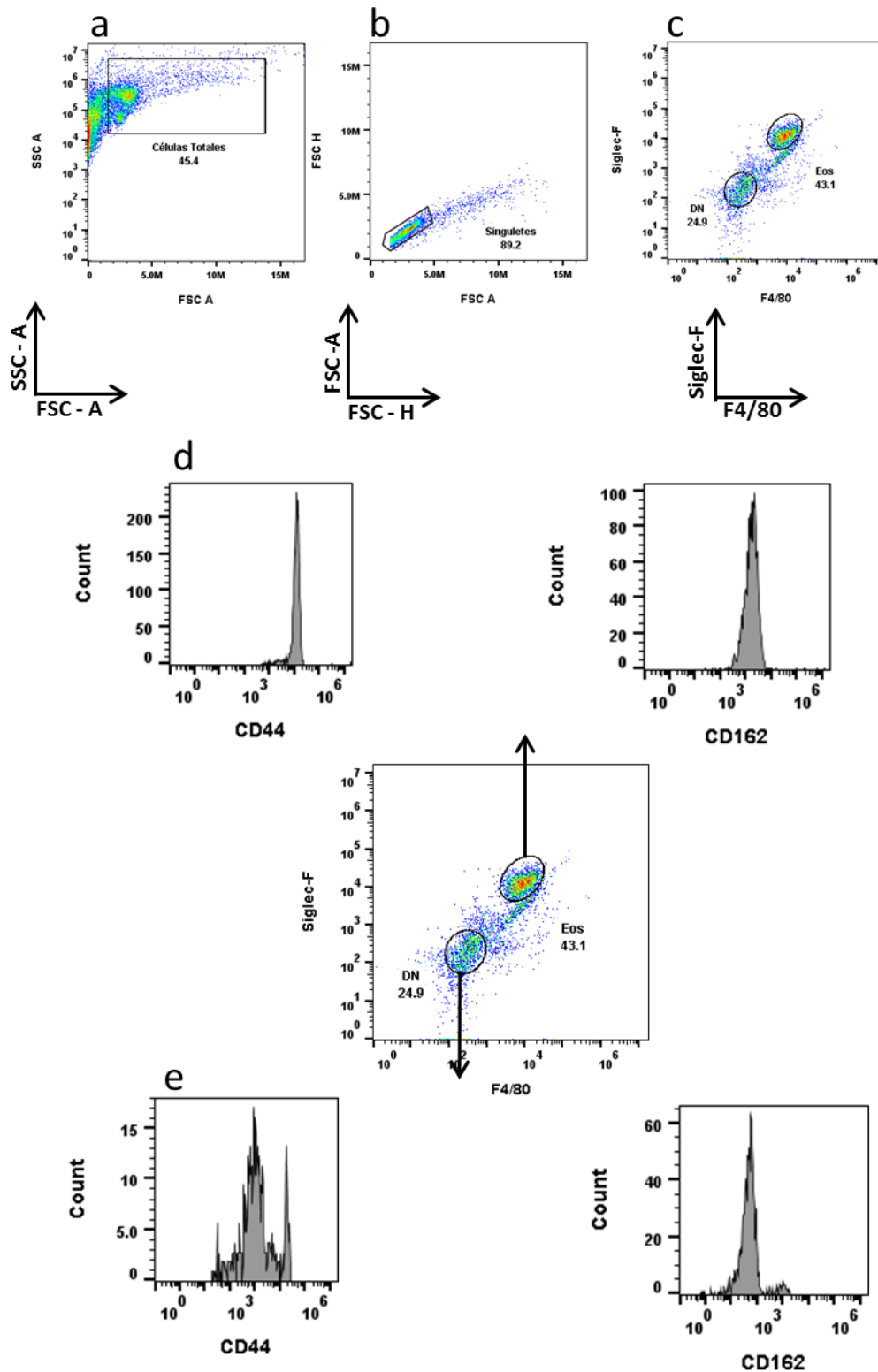


Figura 7.12. Expresión de las moléculas CD162 y CD44 en eosinófilos del hígado de animales infectados por *F. hepatica*. Se muestra la estrategia de gating utilizada para determinar la expresión de las moléculas CD162 y CD44 en eosinófilos hepáticos. Se descartaron los debrís (a), se seleccionaron los singuletes (b) y se seleccionó la población de eosinófilos como Siglec-F⁺ F4/80^{int} (c). Se analizó la expresión de las nombradas moléculas en eosinófilos (d). Se utilizó la población doble negativa (DN) para el control (e). Se muestran resultados representativos de un animal de n=4.