

**Estudios sobre el condicionamiento de
células dendríticas por la larva de
*Echinococcus granulosus s. l.***

Lic. Yamila Martínez

Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología, Biología celular y molecular

Tutores: Dres. Cecilia Casaravilla y Álvaro Díaz

Cátedra de Inmunología
Facultad de Ciencias/Química
Universidad de la República

Setiembre, 2019



*A los Agnese-Buccino,
con enorme gratitud*

Polvo se hará mi guitarra;
Mi memoria... cerrazón;
Mi nombre, puede que muera;
Mi copla... puede que no.

Osiris Rodríguez Castillos, *De Tiempo Adentro*

Agradecimientos

En primera instancia me gustaría agradecer a Cecilia y a Álvaro por haberme guiado en este camino de crecimiento profesional y personal que culmina con este texto. A lo largo de estos años han sido personas muy generosas con su conocimiento y su tiempo. Siempre se mostraron interesados en mejorar este trabajo aportando ideas de experimentos nuevos, artículos para discutir los resultados y planear nuevas formas de seguir, y sobre todo sentándose conmigo horas (y horas) a ver gráficas de todo tipo y forma. A ellos les debo agradecer todo mi aprendizaje académico porque son excelentes profesionales, pero además, y particularmente importante para mí, les debo agradecer su don de gente. Siempre voy a recordar los gestos de comprensión, paciencia, y cariño que han tenido para conmigo en estos últimos, y especialmente difíciles, años.

También les quiero agradecer muy especialmente a mis amigos de la Cátedra de Inmunología, los de la casita del medio y los otros. Ellos hicieron de nuestro lugar de trabajo un ambiente cálido, divertido y de colaboración mutua. A Valeria, Mery, Luchis, Mauri y Maite gracias por estar y escuchar, por ser un paracaídas en los momentos difíciles y un trampolín en los buenos, por ser tan buena gente. A Cami, por ser mi querida sis del corazón, porque somos el inmunocomplejo del laboratorio, aunque las medallas digan lo contrario. A Ana, por los consejos de madre académica, sin ser yo su hija académica, por ayudarme a ordenar ideas y quererles, por ayudarme a buscar Mi camino. A mis compañeros todos, por demostrarme cariño a diario. Debo reconocer al idioma impotente ante la necesidad de expresar un sentimiento de gratitud tan grande.

Gracias, también, a Carlos González, quien de forma amable y desinteresada nos enseñó estadística, ayudándonos a extraer hasta la última conclusión de nuestros resultados.

Por último, y no menos importante, agradezco enfáticamente a las agencias que financiaron este trabajo: Comisión Académica de Posgrado (CAP), Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), sin ellas nada de esto hubiese sido posible.

A todos ellos, infinitas gracias.

Resumen

Echinococcus granulosus s. l. designa al grupo de especies de parásitos helmintos responsables de causar hidatidosis. Nuestro grupo trabaja en el estudio de la interacción de su larva, también llamada hidátide, con el sistema inmune del hospedero. La hidátide es una estructura sub-esférica llena de líquido delimitada por dos capas: la capa germinativa, interna y de naturaleza celular, y la capa laminar (LL, del inglés *laminated layer*), expuesta al exterior, de naturaleza acelular y compuesta principalmente por mucinas. La LL interacciona directamente con el medio interno del hospedero, potencialmente contribuyendo a la regulación de la respuesta inflamatoria que caracteriza a la hidatidosis.

Nuestro grupo ha evaluado los efectos inmunológicos de una preparación de partículas de la LL (pLL, del inglés *particulate Laminated Layer*) sobre células clave para la iniciación y regulación de la respuesta inmune, las células dendríticas (DC), utilizando como modelo DC derivadas de médula ósea de ratón (BMDC). En respuesta a este estímulo, en presencia o ausencia de un agonista de TLR (como el LPS), las BMDC adoptan fenotipos “semi-maduros”, que en otros sistemas biológicos se han vinculado a la inducción de tolerancia. En la primera parte de este trabajo estudiamos los mecanismos mediante los cuales pLL condiciona a las BMDC. Encontramos que la inducción de los fenotipos semi-maduros en términos de las moléculas co-estimuladoras CD40 y CD86 depende del contacto íntimo entre las células y las partículas, a nivel de células individuales. Además, observamos que las células co-estimuladas con pLL+LPS liberan señales capaces de moderar la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40 y CD86 en BMDC que no contactan las partículas, descartando la participación de la IL-10 en este efecto. Por otro lado, el tamaño de las partículas presentes en pLL es heterogéneo, e incluye tamaños fagocitables y no fagocitables. Así, pLL como modelo contempla la situación en la que las DC, en el contexto de la infección, encuentran a partículas liberadas de la LL, pero no la situación de contacto de las DC con la superficie de la hidátide como tal. Por esta razón, pusimos a punto un protocolo de obtención de partículas de LL de tamaño no fagocitable (pLL^{NP}). Las BMDC estimuladas con pLL^{NP} presentaron los fenotipos semi-maduros (en ausencia y presencia de LPS) similares a los previamente descritos, indicando que la inducción de dichos fenotipos no requiere la fagocitosis de partículas microscópicas.

Además, evaluamos la funcionalidad de las BMDC estimuladas con pLL^{NP} y luego separadas de las partículas, mediante ensayos de co-cultivo con células T CD4⁺ purificadas de otro haplotipo. Las BMDC estimuladas únicamente con pLL^{NP} indujeron en el co-cultivo la expresión de IL-5 e IL-17, y en co-estimulación con LPS, el condicionamiento con pLL^{NP} potenció la expresión de IL-17. Así, el fenotipo inducido en BMDC en respuesta al material parasitario pareció dirigir la respuesta T en direcciones T_H2 y T_H17.

Por otra parte, estudiamos el fenotipo adquirido por DC en el contexto de la infección secundaria experimental crónica de ratones. Observamos que las DC del sitio de infección (cavidad peritoneal, CP) y de ganglios mesentéricos presentaron fenotipos de activación “mínimos” (similares a los descritos en otras infecciones por helmintos), caracterizados por leves aumentos en la expresión de CD86 y CD40. Además, las DC de CP ratones infectados presentaron un fuerte aumento de la expresión de las moléculas co-inhedoras PD-L1 y PD-L2. Estos cambios no se vieron acompañados por expansión de la población de LT_{reg} FoxP3⁺, por lo que los posibles mecanismos inmunosupresores implementados por *E. granulosus* en la etapa crónica de la infección podrían ser dependientes del eje PD-L1/2 - PD-1, pero independientes de la expansión de LT_{reg} FoxP3⁺.

Por último, la estimulación *ex vivo* con antígenos del parásito reveló la presencia de componentes de respuestas de tipo T_H2, T_H1 y probablemente T_H17 en células de ganglio mesentérico, y de componentes de tipo T_H2 en células de bazo. Adicionalmente observamos que el condicionamiento por pLL aumenta la producción de IL-17 por células de bazo. Este resultado, junto con la producción de IL-17 observada en los ensayos de MLR (del inglés, *mixed lymphocyte reaction*), sugiere que las partículas de LL podrían contribuir a inducir, en el contexto de infección, un componente T_H17 de respuesta.

En suma, en este trabajo profundizamos en el estudio de los mecanismos de condicionamiento de BMDC por partículas de LL y en la funcionalidad de las células así condicionadas. Además, profundizamos en la descripción del fenotipo adquirido por DC y aspectos de la respuesta T en la infección secundaria crónica experimental con *E. granulosus s. l.*

Lista de abreviaturas

ADCC: citotoxicidad mediada por anticuerpos (del inglés, *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AgB: Antígeno B de *Echinococcus granulosus s. l.*
APC: célula presentadora de antígeno (del inglés, *Antigen Presenting Cells*)
APC: alofocianina (del inglés, *AlloPhycoCyanin*)
APCCy7: conjugado en tándem de APC y cianina Cy7
BMDc: células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (del inglés, *Bone Marrow-derived Dendritic Cells*)
BSA: seroalbúmina bovina (del inglés, *Bovine Serum Albumin*)
CHEA: Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República
COX2: cicloxigenasa 2
CP: cavidad peritoneal
CytD: citocalasina D
DAMP: patrones moleculares asociados a peligro (del inglés, *Damage-Associated Molecular Patterns*)
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DC: célula dendrítica (del inglés, *dendritic cell*)
DC-SIGN: receptor de lectina C tipo II (del inglés, *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*)
DILAVE: Dirección de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
DMSO: dimetilsulfóxido
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético (del inglés, *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
ELISA: enzimoimmunoensayo (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
E/S: productos de excreción/secreción
FITC: isotiocianato de fluoresceína (del inglés, *Fluorescein IsoThioCyanate*)
FoxP3: factor de transcripción (del inglés, *Forkhead box P3*)
FMO: controles de citometría con todos los anticuerpos menos uno (del inglés, *Fluorescence Minus One*)
FSC: dispersión de luz hacia delante (del inglés, *Forward Scattered light*)
GL: capa germinativa (del inglés, *Germinal Layer*)
GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés, *Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor*)
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HRP: peroxidasa de rábano (del inglés, *horseradish peroxidase*)
IFN- γ : interferón gama
IgE: inmunoglobulina de clase E
IgG: inmunoglobulina de clase G
IgM: inmunoglobulina de clase M
IL: interleuquina
IL-12p40: subunidad de 40 kDa de la IL-12 y la IL-23
InsP6: myo-Inositol hexakisfosfato
ITAM: inmunoreceptor con motivo de activación basado en tirosina (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*)
ITIM: inmunoreceptor con motivo de inhibición basado en tirosina (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*)
IP: intraperitoneal
kDa: kilodalton
LB: linfocito B
LL: capa laminar (del inglés, *Laminated Layer*)

LT: Linfocito T

LPS: lipopolisacárido (de *Escherichia coli*)

MATS: señalización por afinidad a membrana (del inglés, *Membrane Affinity Triggered Signaling*)

M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos (del inglés, *Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

MHCII: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (del inglés, *Major Histocompatibility Complex II*)

MyD88: proteína adaptadora asociada a TLRs (del inglés, *myeloid differentiation primary-response protein 88*)

NFκB: factor de transcripción (del inglés, *Nuclear Factor kappa B*)

NK: célula asesina natural (del inglés, *Natural Killer cell*)

NO: óxido nítrico

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés, *phosphate-buffered saline*)

PE: ficoeritrina (del inglés, *PhycoErythrin*)

PE-Cy7: conjugado en tándem de PE y la cianina Cy7

PerCP: proteínas peridina clorofila (del inglés, *Peridinin-Chlorophyll Proteins*)

PFA: para-formaldehído

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)

PD-L1: ligando 1 de los receptores de muerte programada (del inglés, *Programmed Death Ligand-1*)

PD-L2: ligando 2 de los receptores de muerte programada (del inglés, *Programmed Death Ligand-2*)

PGE₂: prostaglandina E 2

PI3K: fosfoinositol 3-quinasas (del inglés, *Phosphatidylinositol-3-Kinases*)

pLL: preparación particulada de LL (del inglés, *particulate Laminated Layer*)

pLL^{NP}: preparación particulada de LL de tamaño no fagocitable (del inglés, *non fagocitable particulate Laminated Layer*)

PNA: aglutinina de maní (del inglés, *peanut agglutinin*)

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, *pattern recognition receptors*)

Psc: protoscólex

Ratón KO: ratón modificado por ingeniería genética en el que uno o más de sus genes están inactivados (del inglés, *Knockout*)

RPMI: medio del Instituto Roswell Park (del inglés, *Roswell Park Memorial Institute Medium*)

RT PCR: reacción de cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (del inglés, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

SEA: antígenos solubles de huevos de *Schistosoma mansoni* (del inglés, *soluble egg antigen*)

SBF: suero bovino fetal

STAT: factor de transcripción (del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription*)

Strep: estreptavidina (del inglés, *streptavidin*)

SI: sistema inmune

Syk: quinasa de tirosina de bazo (del inglés, *Spleen tyrosine kinase*)

TCR: receptor del linfocito T (del inglés, *T Cell Receptor*)

TGF-β: Factor de Crecimiento Transformante beta (del inglés, *Transforming Growth Factor beta*)

TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *Tumor Necrosis Factor alfa*)

T_H: linfocito T colaborador (del inglés, *T helper lymphocyte*)

TLR: receptor de tipo Toll (del inglés, *Toll-like Receptor*)

UoE: Universidad de Edimburgo (del inglés, *University of Edinburgh*)

Ym1 (ChiL3): proteína tipo quitinasa 3

Índice de contenidos

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Lista de abreviaturas	v
1. Introducción	1
1.1. Generalidades de <i>Echinococcus granulosus s. l.</i>	1
1.2. Ciclo de vida de <i>Echinococcus sp</i>	2
1.3. Hidátide	4
1.4. Capa laminar de <i>E. granulosus s. l.</i>	6
1.5. Respuesta inmunológica frente a helmintos	7
1.5.1. Generalidades del sistema inmune	7
1.5.2. Respuestas inmunitarias frente a helmintos	11
1.5.3. Respuesta inmunitaria frente al metacestodo de <i>E. granulosus s. l.</i>	14
1.5.4. Células dendríticas en infecciones con helmintos	15
1.5.5. Condicionamiento de células dendríticas por el metacestodo de <i>E. granulosus s. l.</i>	18
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo general	21
2.2. Objetivos específicos	22
3. Materiales y métodos	23
3.1. Materiales de trabajo	23
3.1.1. Material parasitario	23
3.1.2. Ensayos de diferenciación de microhidátides a partir del cultivo <i>in vitro</i> de protoscólex de <i>E. granulosus s. l.</i>	23
3.1.3. Obtención de un pulverizado fino de capa laminar	24
3.1.4. Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea	26
3.2. Experimentos <i>in vitro</i>	27

3.2.1. Separación de las BMDC de pLL ^{NP}	27
3.2.2. Estudio de la inducción del fenotipo semi-maduro por pLL ^{NP} en BMDC luego de 18 horas de contacto	28
3.2.3. Estudio de la inducción del fenotipo semi-maduro por pLL ^{NP} en BMDC luego de 3 horas de contacto y 18 horas sin contacto	29
3.2.4. Estudio de la necesidad de contacto célula-partícula para la inducción del fenotipo semi-maduro en BMDC	30
3.2.5. Ensayos de bloqueo de IL-10	31
3.2.6. Ensayos utilizando inhibidores de la dinámica del citoesqueleto de actina y de la señalización a través de PI3K de clase I	31
3.2.7. Ensayos de reacción linfocitaria mixta	32
3.3. Experimentos <i>in vivo</i>	32
3.3.1. Ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	32
3.4. Técnicas de análisis	34
3.4.1. Tinciones de marcadores de superficie celular	34
3.4.2. Marcado del factor de transcripción FoxP3	36
3.4.3. Tinciones con sondas de viabilidad	37
3.4.4. Cuantificación de citoquinas en solución mediante ELISA	38
3.4.5. Microscopía de epifluorescencia	40
3.4.6. Microscopía de campo claro	41
3.5. Análisis estadístico	41
4. Resultados	43
4.1. Condicionamiento de células dendríticas por la larva de <i>E. granulosus s. l.</i>	43
4.1.1. Estudio de los mecanismos de condicionamiento de BMDC por pLL	43
4.1.2. Evaluación de los efectos de pLL ^{NP} sobre BMDC	51
4.1.3. Optimización de estrategias para la separación de BMDC de las partículas de pLL ^{NP}	56
4.1.4. Evaluación de la funcionalidad de BMDC condicionadas con pLL ^{NP} 63	

4.2. Ensayos empleando el modelo de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	64
4.2.1. Análisis global de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de ratones infectados por <i>E. granulosus s. l.</i>	65
4.2.2. Estudio del fenotipo adquirido por células dendríticas en el modelo de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	67
4.2.3. Estudio del fenotipo adquirido por linfocitos T en los ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	78
4.2.4. Estudio de la respuesta de los linfocitos T desencadenada por la infección secundaria crónica con <i>E. granulosus s. l.</i>	85
5. Discusión	89
5.1. Mecanismos de condicionamiento celular mediados por partículas de pLL	89
5.1.1. Condicionamiento de BMDC por pLL: análisis de mecanismos dependientes e independientes de contacto	89
5.1.2. Estudio del papel de la fagocitosis sobre la inducción del fenotipo semi-maduro por partículas de LL sobre BMDC	94
5.2. Análisis de la funcionalidad de BMDC estimuladas con pLL ^{NP}	96
5.3. Análisis de la respuesta celular local en el modelo de infección secundaria con <i>E. granulosus s.l.</i>	99
5.4. Análisis de la producción de citoquinas en ganglios mesentéricos y bazo en el modelo de infección secundaria con <i>E. granulosus s.l.</i>	104
6. Conclusiones y perspectivas	108
7. Bibliografía	110
8. Anexo	119
8.1. Figuras suplementarias (células dendríticas)	120
8.2. Figuras suplementarias (linfocitos T)	126
8.3. Diferenciación de microhidátides de <i>E. granulosus s. l.</i> a partir del cultivo <i>in vitro</i> de protoscólices	129

Índice de figuras y tablas

Tabla 1.1.1. Distribución geográfica y hospederos preferenciales de las especies comprendidas en el grupo <i>E. granulosus s. l.</i>	1
Figura 1.2.1. Esquema del ciclo de vida de <i>E. granulosus sp.</i>	3
Figura 1.2.2. Esquema de los protoscólices de <i>E. granulosus sp.</i>	4
Figura 1.3. Esquema de la hidátide de <i>E. granulosus sp</i>	5
Figura 1.4. Microscopía electrónica de la LL de <i>E. granulosus</i>	7
Figura 1.5.1. Heterogeneidad de los diferentes tipos de LT CD4 ⁺	11
Figura 1.5.5. Microscopía de fluorescencia de partículas de PII	19
Tabla 3.4.1. Anticuerpos y sondas de viabilidad utilizados en citometría de flujo	36
Tabla 3.4.4. Reactivos utilizados para medición de citoquinas por ELISA	39
Figura 4.1.1.1. El contacto de las células con pLL, a nivel de célula individual, es indispensable para la inducción del fenotipo semi-maduro completo	45
Figura 4.1.1.2. Efectos del bloqueo de la IL-10 sobre la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 en BMDC	47
Figura 4.1.1.3. Efectos del bloqueo de la IL-10 sobre la expresión de la molécula co-estimuladora CD40 en BMDC	48
Figura 4.1.1.4. Efectos del bloqueo de la IL-10 sobre BMDC que contactan o no PII	49
Figura 4.1.1.5. Efectos del bloqueo de la IL-10 sobre la producción de la IL-12 en BMDC	50
Figura 4.1.2.1. Comparación del tamaño de las partículas de pLL y pLL ^{NP} entre sí, y con el tamaño de las BMDC	52
Figura 4.1.2.2. Evaluación de los efectos de diferentes dosis de pLL ^{NP} sobre BMDC	53
Figura 4.1.2.3. La inducción del fenotipo semi-maduro en BMDC es independiente de la fagocitosis	54
Figura 4.1.2.4. Los efectos de pLL ^{NP} sobre las BMDC dependen del citoesqueleto de actina y de la señalización a través de PI3K de clase I	55
Figura 4.1.3.1. Separación de las BMDC de las partículas de pLL ^{NP}	58
Figura 4.1.3.2. La filtración de las BMDC no altera el fenotipo inducido por pLL ^{NP} en ausencia o presencia de LPS	59
Figura 4.1.3.3. Los efectos de pLL ^{NP} se pueden observar luego de sólo 3 horas en presencia de las partículas seguidas de 18 horas adicionales en ausencia de las mismas	62
Figura 4.1.4.1. Evaluación de la funcionalidad de BMDC condicionadas con pLL ^{NP} en ensayos MLR: estudio de la producción de citoquinas	64
Figura 4.2.1.1. Análisis global de la celularidad de la CP de ratones con infección secundaria de 6 meses por <i>E. granulosus s. l.</i>	66
Figura 4.2.2.1. Estrategia de <i>gating</i> utilizada para definir DC de CP en los ensayos de infección secundaria por <i>E. granulosus s. l.</i>	67
Figura 4.2.2.2. Definición de DC de CP en los experimentos de infección secundaria por <i>E. granulosus s. l.</i>	68
Figura 4.2.2.3. Análisis del número y porcentaje de DC de CP en los experimentos de infección secundaria por <i>E. granulosus s. l.</i>	69
Figura 4.2.2.4. Expresión de la molécula co-estimuladora CD40 en DC de CP en infección secundaria por <i>E. granulosus s. l.</i>	72
Figura 4.2.2.5. Expresión de la molécula co-estimuladora CD86 en DC de CP en infección secundaria por <i>E. granulosus s. l.</i>	73

Figura 4.2.2.6. Expresión de la molécula co-estimuladora CD80 en DC de CP en infección secundaria por <i>E. granulosus s. l.</i>	74
Figura 4.2.2.7. Expresión de la molécula co-inhibitoria PD-L1 en DC de CP en infección secundaria por <i>E. granulosus s. l.</i>	75
Figura 4.2.2.8. Expresión de la molécula co-inhibitoria PD-L2 en DC de CP en infección secundaria por <i>E. granulosus s. l.</i>	76
Figura 4.2.2.9. Análisis global del fenotipo de las DC de ganglio mesentérico en los ensayos de infección secundaria crónica con <i>E. granulosus s. l.</i>	77
Figura 4.2.3.1. Estrategia de <i>gating</i> utilizada para definir linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en los ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	78
Figura 4.2.3.2. Definición de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ provenientes de CP en los ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	79
Figura 4.2.3.3. Análisis del número de LT CD4 ⁺ de CP en los ensayos de infección secundaria por <i>E. granulosus s. l.</i>	80
Figura 4.2.3.4. Expresión de la molécula intracelular FoxP3 en LT CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de CP en los ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	81
Figura 4.2.3.5. Estudio de la expresión de FoxP3 en LT CD4 ⁺ de CP en los ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	84
Figura 4.4.3.6. Estudio de los LT CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de ganglio mesentérico en los ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	85
Figura 4.2.4.1. Estudio de la respuesta de células de ganglio mesentérico y bazo a la re-estimulación con LH y al condicionamiento por pLL, en ensayos de infección secundaria crónica con <i>E. granulosus s. l.</i>	87
Figura 5.1.1. Análisis de los mecanismos del condicionamiento de BMDC por pLL	93
Figura 8.1.1. Estrategia de <i>gating</i> utilizada para definir DC de ganglio mesentérico en los ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	119
Figura 8.1.2. Definición de DC de ganglio mesentérico en los experimentos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	120
Figura 8.1.3. Expresión de la molécula co-estimuladora CD40 en DC de ganglios mesentéricos en un modelo de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	121
Figura 8.1.4. Expresión de la molécula co-estimuladora CD86 en DC de ganglios mesentéricos en un modelo de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	122
Figura 8.1.5. Expresión de la molécula co-estimuladora CD80 en DC de ganglios mesentéricos en un modelo de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	123
Figura 8.1.6. Expresión de la molécula co-inhibidora PD-L1 en DC de ganglios mesentéricos en un modelo de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	124
Figura 8.1.7. Expresión de la molécula co-inhibidora PD-L2 en DC de ganglios mesentéricos en un modelo de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	125
Figura 8.2.1. Definición de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ provenientes de ganglios mesentéricos en los ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	126
Figura 8.2.2. Expresión del factor de transcripción FoxP3 en LT CD4 ⁺ de ganglio mesentérico en los ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	127
Figura 8.2.3. Expresión del factor de transcripción FoxP3 en LT CD8 ⁺ de ganglio mesentérico en los ensayos de infección secundaria con <i>E. granulosus s. l.</i>	128
Figura 8.3.1. Ensayos de diferenciación de microhidátides de <i>E. granulosus s. l.</i> a partir del cultivo <i>in vitro</i> de protoscolex	130

1. Introducción

1.1. Generalidades de *Echinococcus granulosus s. l.*

Echinococcus granulosus, en el sentido amplio, o *sensu lato* (*s. l.*), es el parásito helminto que causa la enfermedad conocida como hidatidosis. Desde el punto de vista taxonómico, *E. granulosus s. l.* se clasifica dentro del Phylum Platyhelminthes, Clase Cestoda, Familia Taeniidae, Género *Echinococcus*. *E. granulosus s. l.* es un grupo diverso, compuesto por diferentes especies y cepas. La secuenciación del ADN mitocondrial ha revelado la existencia de diez genotipos (G1 - G10) dentro del grupo, que se diferencian principalmente en su distribución geográfica y en el mamífero utilizado como hospedero intermediario. Actualmente, *E. granulosus s. l.* se clasifica en cinco especies: *E. granulosus sensu stricto* (*s.s*) (G1 – G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5), *E. canadensis* (G6 – G10) y *E. felidis*. En la Tabla 1 se muestran los hospederos intermediarios de las diferentes especies y su distribución geográfica¹.

La hidatidosis es una zoonosis de gran importancia en países con alta actividad ganadera, como Uruguay. Las pérdidas económicas asociadas a estas infecciones se deben a la menor productividad del ganado y al tratamiento de pacientes infectados. En este sentido, en un reporte del año 2000, *Torgerson y cols.*² estimaron que las pérdidas económicas debidas a hidatidosis en nuestro país ascendían a U\$S 22.9 millones/año.

Especie	Hospedero definitivo	Hospedero intermediario	Distribución
<i>Echinococcus granulosus sensu stricto</i>	Perro, lobo, dingo, chacal y otros cánidos	Oveja, cabra, vacas, cerdos, camello, búfalo, caballo, ungulados salvajes, marsupiales, etc.	Cosmopolita
<i>Echinococcus canadensis</i>	Perro, lobo	Cerdo, camello y cérvidos	Eurasia, África, Norte y Sudamérica
<i>Echinococcus ortleppi</i>	Perro	Vaca	Eurasia y África
<i>Echinococcus felidis</i>	León	Hiena, jabalí, cebra, ñu, búfalo, cerdo del arbusto, varios antílopes, jirafa e hipopótamo.	África
<i>Echinococcus equinus</i>	Perro	Caballo, otros équidos y cérvidos	Eurasia y África

Tabla 1.1.1. Distribución geográfica y hospederos preferenciales de las especies comprendidas en el grupo *E. granulosus s. l.*

1.2. Ciclo de vida de *Echinococcus sp.*

El ciclo de vida de *E. granulosus s. l.* es complejo e involucra a un hospedero definitivo que es un mamífero carnívoro (típicamente cánido) en cuyo intestino delgado se desarrolla la forma adulta del parásito, y a un hospedero intermediario que es un mamífero herbívoro u omnívoro (típicamente ungulado) en cuyas vísceras se desarrolla la larva del parásito (también llamada metacestodo o hidátide) (Figura 1.2.1).

La forma adulta del parásito es un gusano hermafrodita de 2 a 6 mm que se reproduce sexualmente para producir huevos que contienen la forma infectiva de los hospederos intermediarios: las oncósferas. Los huevos son estructuras ligeramente ovoides de unos 30 μm de diámetro que constituyen la forma de resistencia del parásito³. Esto último se explica por la existencia de una gruesa capa de queratina que rodea a las oncósferas denominada embrióforo. Una vez que el huevo es ingerido por el hospedero intermediario, los ácidos estomacales promueven la disgregación del embrióforo liberando así a la oncósfera, que penetra el epitelio digestivo alcanzando la circulación linfática o venosa para finalmente establecerse en las vísceras (típicamente hígado o pulmones) del hospedero intermediario, y diferenciarse en la hidátide. La hidátide es una estructura llena de líquido, turgente, semi-esférica, en cuyo interior se producen por reproducción asexual los protoscólices (psc), la forma infectiva del hospedero definitivo. Los psc presentan estructuras altamente especializadas (ventosas, rostelo y ganchos) para adherirse al intestino delgado del hospedero definitivo; las que mantienen invaginadas mientras se encuentran dentro de la hidátide (Figura 1.2.2). Los psc conservan además el potencial de reproducirse asexualmente, dando lugar a la generación de nuevas hidátides. Esta capacidad dual es la responsable de que en los hospederos intermediarios se puedan producir infecciones secundarias debidas a la ruptura de una hidátide primaria^{4,5}. Como se verá más adelante en este trabajo, dicha capacidad dual se explota para lograr el establecimiento de infecciones secundarias en ratones, por inoculación de psc. Finalmente, una vez que el hospedero definitivo ingiere visceras de ganado infectadas con el parásito, los psc llegan al intestino delgado, al que se adhieren para desarrollarse en la forma adulta del parásito y cerrar así su ciclo de vida⁶.

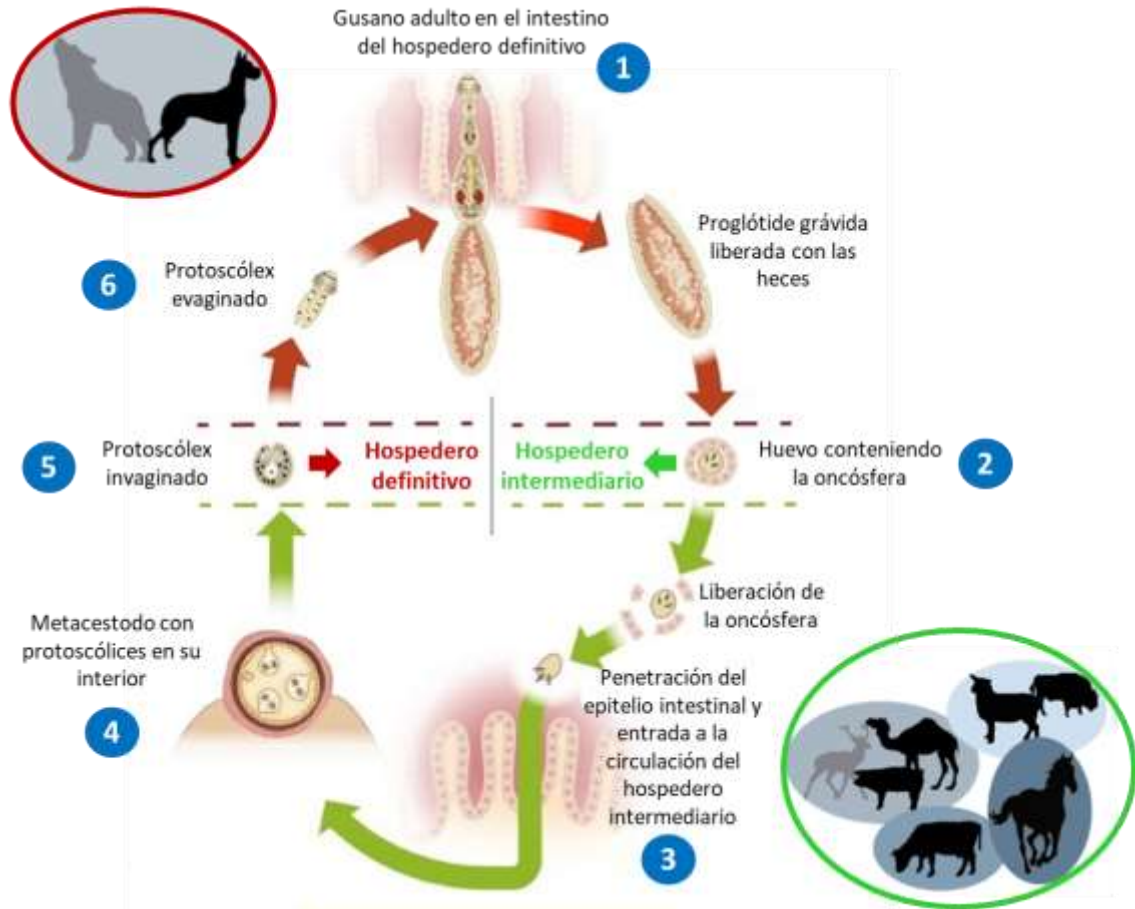


Figura 1.2.1. Esquema del ciclo de vida de *E. granulosus* sp. El gusano adulto se adhiere al intestino delgado del hospedero definitivo (1) y libera huevos (2), que son ingeridos por el hospedero intermediario (3) en el que se desarrolla la hidátide (metacestodo) en sus vísceras (4). En el interior de la hidátide se producen asexualmente protoscólices (5), que al ser ingeridos por el hospedero definitivo y evaginarse (6) dan lugar al desarrollo del gusano adulto. Tomado y adaptado de *Thompson R.C.A., 2017*⁶.

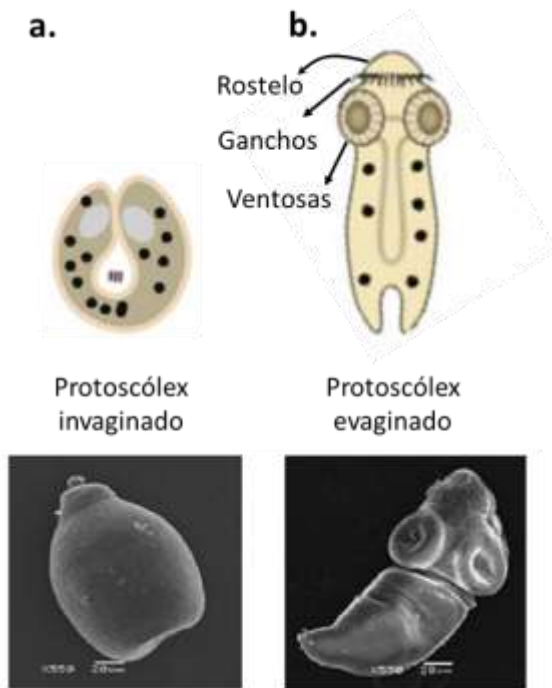


Figura 1.2.2. Esquema de los protoscolices de *E. granulosus* sp. Los psc se forman por reproducción asexual dentro de la hidátide, donde se encuentran en su forma invaginada (a). Cuando son ingeridos por el hospedero definitivo, los psc evaginan su aparato de fijación para lograr adherirse al intestino delgado de su hospedero (b). Debajo de cada esquema se muestra una microscopía electrónica de barrido de las formas invaginada y evaginada de un psc. Tomado y adaptado de Thompson R.C.A., 2017⁶ y Ceballos L., et al., 2011⁷.

1.3. Hidátide

La hidátide es una estructura sub-esférica, unilocular, llena de líquido (líquido hidático, LH) en cuyo interior se generan asincrónicamente, mediante reproducción asexual, los psc. Se encuentra delimitada por dos capas: la capa germinativa (GL, del inglés *germinal layer*), interna y de naturaleza celular; y la capa laminar (LL, del inglés *Laminated Layer*), expuesta al exterior y de naturaleza acelular⁸. En los casos en los que el establecimiento del parásito es favorable, debido a la infección del hospedero diana correspondiente al genotipo parasitario, las hidátides permanecen rodeadas por una capa de colágeno (pobremente infiltrada por células del sistema inmune), producida por el hospedero y denominada capa adventicia. El conjunto de hidátide más capa adventicia es lo que se denomina quiste hidático (Figura 1.3). Sin embargo, en los casos en los que el genotipo parasitario no coincide con el hospedero diana se observan reacciones granulomatosas⁹. Las reacciones granulomatosas en general tienen lugar en respuesta a elementos persistentes en el organismo. La respuesta celular granulomatosa a *E. granulosus* s. l. se caracteriza por la presencia, en íntimo contacto con la LL, de macrófagos especializados (típicos de reacciones granulomatosas en general) denominados células gigantes multinucleadas

y células epiteliales en empalizada. Aunque se desconocen las funciones de dichos tipos celulares, se cree que tendrían sus funciones fagocíticas disminuidas y predominarían las funciones secretoras. Más lejos de la hidátide se encuentran células mononucleares, eosinófilos, linfocitos, macrófagos/monocitos con fenotipos convencionales, fibroblastos y colágeno^{10,9}.

La GL está compuesta por un tegumento sincitial con microvellosidades proyectadas hacia la LL y por células no sincitiales, como células musculares almacenadoras de glucógeno y células indiferenciadas. Estas últimas son responsables de producir vesículas con psc hacia el interior de la hidátide, que en ocasiones, al desarrollar LL, se convierten en hidátides “hijas”^{11,12,13}. La GL, con alta actividad metabólica, es la responsable de producir y secretar, no sólo el contenido del LH y los psc, sino que también a la LL. Las características y ultra-estructura de la LL serán abordadas en la próxima sección.

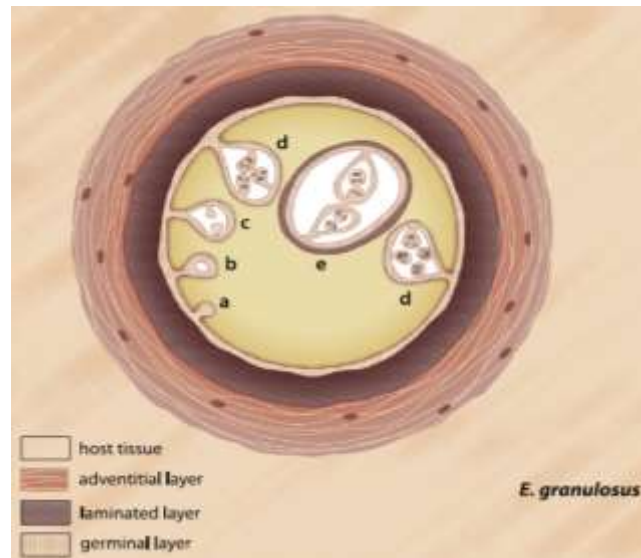


Figura 1.3. Esquema de la hidátide de *E. granulosus* sp. La hidátide es una estructura sub-esférica llena de líquido que se encuentra delimitada por una capa interna llamada capa germinativa y una externa denominada capa laminar. Por fuera de la capa laminar se localiza la capa adventicia, producida por el hospedero cuando el establecimiento de la hidátide es exitoso. En el interior de la hidátide se desarrollan de forma asincrónica los psc, de (a) a (d) se ilustra el proceso de su formación y diferenciación y en (e) se indica una hidátide hija. Tomado y adaptado de *Thompson R.C.A., 2017*⁶.

1.4. Capa laminar de *E. granulosus s. l.*

La LL es una estructura elástica que puede alcanzar hasta 3 mm de grosor y otorga resistencia y soporte mecánico a la hidátide. Ultraestructuralmente, la LL está constituida por una red de fibrillas y acúmulos de gránulos densos a los electrones. Las fibrillas están formadas por mucinas altamente decoradas con *O*-glicanos particularmente ricos en galactosa, y también *N*-acetilgalactosamina y *N*-acetilglucosamina. Los gránulos están compuestos por una sal de mio-inositol hexakisfosfato (InsP6) cálcico (InsP6.Ca). El InsP6 es un compuesto ubicuo en eucariotas, presente en el compartimento citosólico y nuclear de las células. Su ubicación extracelular y en forma de sal cálcica insoluble es, hasta el momento, única de *E. granulosus s. l.* ⁸ (Figura 1.4.1). El entramado de la red de fibrillas permite el pasaje de macromoléculas de (al menos) hasta 150 KDa, desde y hacia el metacestodo¹⁴, siendo, de hecho, el LH una fuente importante de componentes parasitarios contra los que se genera una respuesta humoral durante la infección ¹⁵.

La LL constituye la interfaz entre el parásito y el hospedero y su aparición es clave para la supervivencia del parásito. Concretamente, la aparición de la LL coincide temporalmente con la resolución de la respuesta inflamatoria que se desencadena tempranamente durante la infección^{16,17,18,19,20}. El hecho de que la hidátide pueda alcanzar decenas de centímetros de diámetro y establecer infecciones crónicas sin desencadenar una respuesta inmune acorde tanto al tamaño como a la persistencia de la infección sugiere la existencia de mecanismos inmuno-reguladores ejercidos por dicho parásito. En particular, algunas evidencias señalan a la LL como una posible candidata a contribuir con dichos mecanismos.

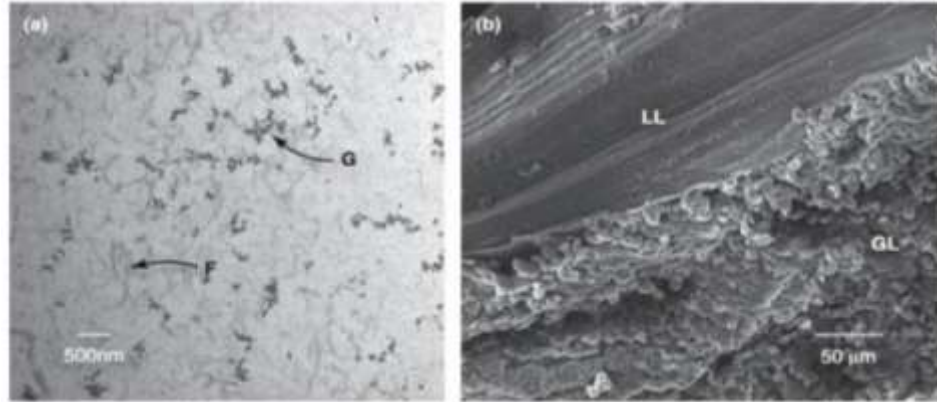


Figura 1.4. Microscopía electrónica de la LL de *E. granulosus s. l.* En (a) se muestra una microscopía electrónica de transmisión de LL y se indican los gránulos de InsP6.Ca (G) y las fibrillas (F) que la componen. En (b) se muestra una microscopía electrónica de barrido en la que se indica la GL, de clara naturaleza celular, y la LL con sus laminaciones características. Tomado de *Díaz A., et al., 2011*⁸.

Se postula que, para crecer, la hidátide debe sufrir fisuras y descascaramiento de las capas más externas de la LL, liberándose material en forma de partículas (debido a su alta insolubilidad) al medio interno del hospedero. En este sentido, se ha reportado la existencia de partículas de LL en el interior de macrófagos circundantes en un modelo de infección experimental con *E. granulosus s. l.*^{21,22} y en sitios distales a la hidátide en infecciones con el parásito relacionado *Echinococcus multilocularis*²³. Este fenómeno se tuvo en cuenta para la preparación del material parasitario con el que se trabajó durante esta Tesis (ver sección 1.5.5).

1.5. Respuesta inmunológica frente a helmintos

1.5.1. Generalidades del sistema inmune

El sistema inmune está compuesto por un grupo de células y moléculas solubles encargadas de reconocer patógenos y responder contra ellos, con el fin de eliminarlos. Tradicionalmente, los componentes del sistema inmune han sido asignados a la rama innata o a la adaptativa. El sistema inmune innato está compuesto por células y componentes solubles que responden rápidamente y constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos. El reconocimiento de los patógenos, o del daño que ellos generan, por esta rama tiene lugar

mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptors*), que se encuentran codificados en la línea germinal de las células. Dichos receptores reconocen motivos moleculares propios de patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*) o asociados a daño tisular (DAMPs, del inglés *Damage Associated Molecular Patterns*). Por su parte, la rama adaptativa del sistema inmune es la encargada de montar respuestas específicas hacia los diferentes patógenos, gracias a que posee un conjunto muy diverso de receptores expresados en linfocitos B y T (BCR y TCR, del inglés *B cell receptor* y *T cell receptor*, respectivamente). La rama adaptativa demora días en activarse, pero tiene el potencial de generar respuestas mucho más eficientes, contribuyendo a la eliminación de patógenos que han evadido y/o no pueden ser controlados por la respuesta inmune innata. Además, y a diferencia de la respuesta inmune innata, la respuesta adaptativa es capaz de generar inmunidad duradera gracias a la generación de células de memoria que frente a un nuevo encuentro con el patógeno responderán más rápido²⁴.

Además de sus funciones de defensa primaria, el sistema inmune innato cumple un rol primordial en la inducción e instrumentación de las respuestas adaptativas contra los patógenos. Así, el patrón de moléculas expresado sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *antigen presenting cells*) y la batería de citoquinas que se inducen al reconocer al patógeno, son clave al momento de interactuar con los linfocitos T (LT, de ahora en más) vírgenes, determinando el tipo de respuesta adaptativa que se desencadenará. Dentro de las APC, las células dendríticas (DC, del inglés *dendritic cells*) son el principal tipo celular en decodificar las señales de los patógenos e inducir respuestas adaptativas²⁵. Dicha inducción está mediada por tres señales: interacción MHC-péptido (MHC del inglés, *major histocompatibility complex*) con el TCR específico, interacción de moléculas co-estimuladoras (como CD80 y CD86) con sus respectivos ligandos sobre los LT (CD28), y secreción de citoquinas que influyen la diferenciación de los LT (señales 1, 2 y 3, respectivamente)²⁶. Además, existe otra molécula co-estimuladora clave en la potenciación de las señales provistas por las APC denominada CD40. Con respecto a las moléculas co-estimuladoras en general, vale aclarar que para la activación de los LT es determinante no sólo el patrón de moléculas expresadas, sino que también el nivel de expresión de estas moléculas sobre la superficie de las DC²⁷. El momento de activación de los LT

por parte de las DC (o *priming*) se denomina sinapsis inmunológica y es el punto de conexión más claro entre la inmunidad innata y la adaptativa. Así pues, el estudio de los diferentes fenotipos adoptados por las DC estimuladas por diferentes tipos de patógenos ha permitido identificar diferentes estados de maduración celular que redundan en la inducción de respuestas adaptativas variadas²⁸. En la sección 1.5.4 se retomará el estudio de las DC en el contexto de las infecciones helmínticas.

Los LT cuyos TCR están formados por las cadenas $\alpha\beta$ cumplen un rol primordial orquestando respuestas específicas contra patógenos de distinta naturaleza biológica (virus, bacterias, protozoarios, helmintos y hongos), y/o regulando la actividad del sistema inmune. Así, existen dos grandes tipos de LT según la expresión del correceptor CD4 o CD8. La principal función de los LT CD8⁺ es la de inducir apoptosis en células infectadas por patógenos citosólicos como virus, y de células tumorales. Sin embargo, también se han descrito LT CD8⁺ con funciones reguladoras del sistema inmune (LT_{reg} CD8⁺)²⁹. Por su parte, los LT CD4⁺ conforman un grupo plástico y heterogéneo de células que se han clasificado, a grandes rasgos, en cinco tipos principales (T_H1, T_H2, T_H17, T_H foliculares y células T reguladoras, T_{reg}) que se caracterizan por la secreción de citoquinas activas sobre diferentes tipos celulares³⁰. Además, se han descrito LT secretoras de citoquinas específicas cuya función aun es poco conocida, como aquellos asociados a las respuestas T_H9 o T_H22³¹. La inducción de uno u otro tipo de LT CD4⁺ depende de las citoquinas presentes en el entorno de la sinapsis inmunológica y la consecuente activación de factores de transcripción específicos.

Brevemente, las células T_H1 se inducen mediante la secreción de IL-12 por parte de las APC, expresan T-bet y Stat4, y su función es colaborar con los macrófagos mediante la producción de IFN- γ , una citoquina que potencia la capacidad de los macrófagos de eliminar patógenos (en especial) intracelulares. Por su parte, las células T_H2 se inducen por IL-4, expresan GATA3 y Stat5, y participan, mediante la secreción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, en la activación y reclutamiento de eosinófilos y macrófagos alternativamente activados, contribuyendo al control de parásitos extracelulares y la reparación de tejidos. Las células T_H17 se inducen por TGF- β e IL-6 en humanos (y, adicionalmente IL-1 β en ratones), expresan ROR γ t y Stat3, y su función es el reclutamiento de neutrófilos mediante la secreción de IL-17, IL-22 e IL-21, contribuyendo así a la eliminación de

bacterias extracelulares y hongos. Por su parte, los LT foliculares se inducen por IL-6 e IL-21, expresan Bcl-6 y CXCR5 y su función es la de dirigir el proceso de diferenciación de los linfocitos B mediante la secreción de IL-21 cumpliendo así un rol fundamental en la inducción de respuestas humorales en los órganos linfoides secundarios³². Por último, la población de LT_{reg} es amplia y heterogénea. A grandes rasgos estas células se han clasificado en naturales (generadas en el timo durante la diferenciación) o inducidas en la periferia. Entre estas células se destacan aquellas que se inducen mediante TGF- β e IL-2, expresan FoxP3 y Stat5, y se caracterizan por inhibir las funciones efectoras de otros LT mediante la secreción de IL-10 y TGF- β , entre otros mecanismos. Vale aclarar que se ha visto que las células de un cierto tipo rara vez secretan todas las citoquinas características de su linaje, y que LT “comprometidos” en un cierto subgrupo de diferenciación pueden cambiar su fenotipo y adquirir funciones propias de otro linaje³⁰. En el contexto de una gran y creciente complejidad del estudio de los LT CD4⁺, en la Figura 1.5.1 se ilustra una versión simplificada de los procesos de diferenciación de estas células.

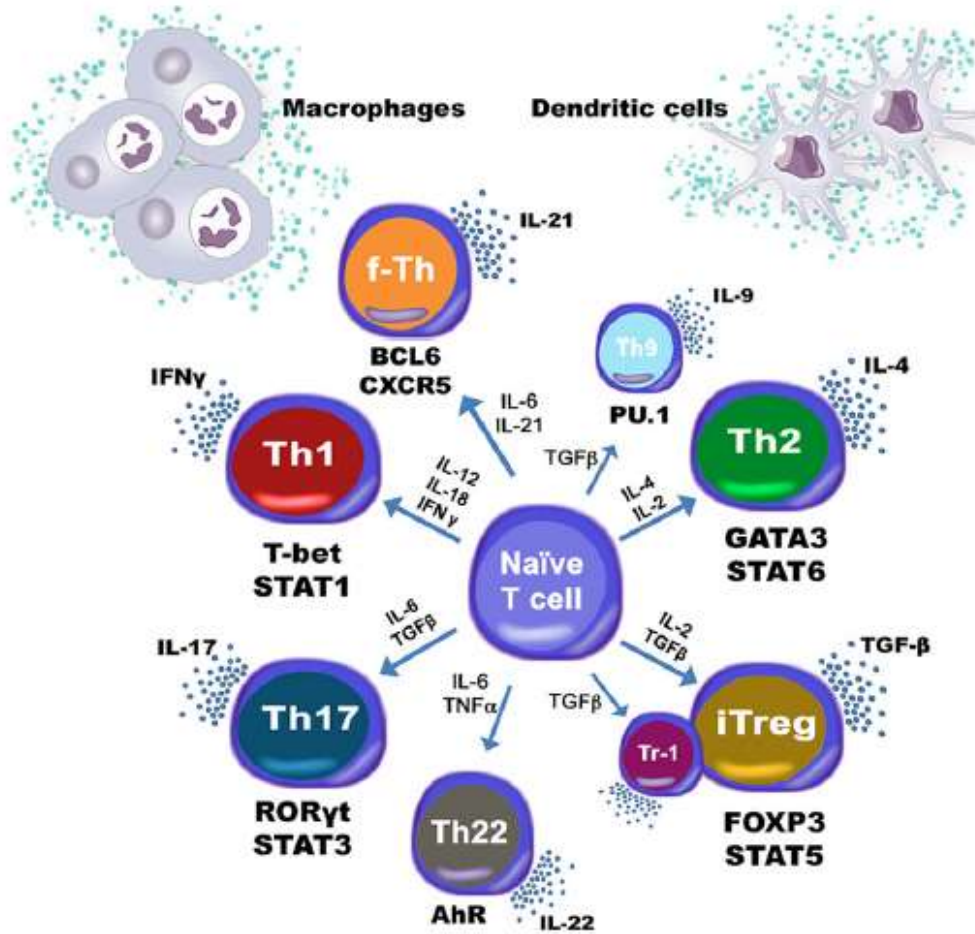


Figura 1.5.1. Heterogeneidad de los diferentes tipos de LT CD4⁺. LT tipo 1 (T_{H1}), tipo 2 (T_{H2}), tipo 17 (T_{H17}), tipo 9 (T_{H9}), tipo 22 (T_{H22}), foliculares (f-LT), reguladores inducidos (iT_{reg}) y reguladores tipo 1 (Tr-1) son inducidos por diferentes citoquinas secretadas por células dendríticas y macrófagos entre otros tipos celulares del sistema inmune innato. Tomado de *Carbo A., et al., 2014*³³.

1.5.2. Respuestas inmunitarias frente a helmintos

Los helmintos son organismos multicelulares, en su mayoría parásitos, que pertenecen a grupos filogenéticamente divergentes (platelmintos y nematodos). Pese a esta heterogeneidad, desde el punto de vista inmunológico estos organismos tienen en común la inducción en sus hospederos de un mismo (y amplio) tipo de respuesta inmunitaria: polarizada a tipo T_{H2}^{34,35,36}. Como se mencionó antes, este tipo de respuestas no sólo implementa mecanismos efectores

capaces de dañar/encapsular a los helmintos, sino que también cumple un rol importante en la reparación de tejidos dañados por el pasaje y/o establecimiento de dichos parásitos³⁷.

Los principales componentes celulares de la respuesta tipo T_H2 son los eosinófilos, basófilos, mastocitos, macrófagos alternativamente activados, linfocitos innatos productores de citoquinas de tipo 2 (ILCs, del inglés *innate lymphoid cells*) y LT del linaje T_H2 (secretoras de IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13). A nivel humoral este tipo de respuestas se caracterizan por la producción de IgE y, en humanos, de IgG1 e IgG4³⁸.

Las citoquinas de tipo T_H2 son las principales inductoras de los mecanismos efectores típicos de las respuestas T_H2. Así, en la mucosa intestinal, las células epiteliales del intestino responden a la IL-4 e IL-13 promoviendo la diferenciación de células productoras de mucus (células caliciformes) y la producción de RELM β , una citoquina con actividad anti-helmíntica³⁴. Además, la IL-4 promueve la contracción muscular y el recambio de células epiteliales, ambos mecanismos cruciales para la expulsión de parásitos intestinales. En la misma línea, la IL-9 (en presencia de IL-18) promueve la proliferación de mastocitos que secretan proteasas capaces de romper las uniones epiteliales estrechas favoreciendo así el “barrido” de parásitos debido al pasaje de fluido desde el medio interno hacia la luz del intestino³⁷.

En los tejidos no mucosos, la respuesta inmune contra los helmintos se centra en controlar la infección mediante la utilización de mecanismos efectores que incluyen aquellos mediados por la unión de IgE a receptores Fc expresados por células del sistema inmune innato como mastocitos y basófilos³⁷. Dentro de la respuesta inmune innata en dichos tejidos, los eosinófilos eran considerados hasta hace poco, células clave de la respuesta anti-helmíntica; sin embargo, más y más evidencia indica que su principal función es promover la reparación celular y secretar citoquinas de tipo T_H2 (como IL-4)³⁴. En la misma línea, los basófilos ofician de fuente innata de IL-4^{38,37}. Así, la presencia de IL-4 e IL-13 en el sitio de infección promueve la diferenciación de macrófagos con fenotipo M2 (macrófagos alternativamente activados). Los macrófagos con este fenotipo cumplen un rol fundamental en la reparación de tejidos y se caracterizan por poseer una fuerte actividad de la enzima arginasa-1, por secretar ChiL-3 (de ahora en más nombrada por su abreviatura más usual, Ym1) y RELM- α (todas ellas moléculas inducidas en respuesta al daño tisular)³⁹. Por su parte, la rama adaptativa de la inmunidad está

representada por LT de tipo T_H2 secretoras de citoquinas implicadas en la potenciación de los mecanismos efectores mediados por células innatas y por LB productores de IgE⁴⁰.

Se ha visto que las respuestas inmunes anti-helmínticas se caracterizan por la presencia de componentes reguladores superpuestos a la respuesta T_H2. El hallazgo de varias poblaciones celulares y citoquinas de tipo regulador en las respuestas inmunitarias contra helmintos dio lugar a la definición de un nuevo tipo de respuesta T_H2, denominada “respuesta T_H2 modificada”, en la que se superponen mecanismos de las respuestas T_H2 y T_{reg}^{41,42}. Así pues, las respuestas anti-helmínticas se encuentran en algún punto de un espectro que va desde respuestas puramente de tipo T_H2 hasta respuestas con una fuerte predominancia de células reguladoras. En concreto, la respuesta T_H2 modificada se caracteriza por la inhibición de la secreción de IL-5 e IL-13 por parte de los LT de tipo T_H2, producción de citoquinas anti-inflamatorias (como IL-10 y TGF-β), y por la proliferación de varias poblaciones celulares reguladoras involucradas en la reparación de tejidos (usualmente dañados por este tipo de patógenos), como macrófagos alternativamente activados que expresan PD-L2 y secretan IL-10 y TGF-β, células mieloides supresoras (MDSC, del inglés *myeloid-derived suppressor cells*) y LT_{reg} (naturales e inducidos, productores de IL-10 y TGF-β)^{37,43,44,45,46}. Así, mientras que la respuesta de tipo T_H2 es una respuesta al reconocimiento de los parásitos, la porción reguladora de la respuesta parece responder a mecanismos de adaptación de los parásitos a sus hospederos que permiten que sean tolerados y se establezcan crónicamente^{35,37,47}. En este sentido, datos epidemiológicos muestran una correlación negativa entre las infecciones por helmintos y la incidencia de inmunopatologías como alergias y enfermedades autoinmunes. Se postula que el estilo de vida actual (higiene personal, desarrollo de vacunas, etc) ha desembocado en la ausencia de estímulos ambientales inmunoreguladores, por lo que ha aumentado la incidencia de respuestas inmunes exacerbadas; este postulado se concretó en lo que se dio a llamar la “Hipótesis de la higiene”^{48,49}.

1.5.3. Respuesta inmunitaria frente al metacestodo de *E. granulosus s. l.*

La respuesta inmune desencadenada frente al metacestodo de *E. granulosus s. l.* varía con el tiempo de infección, pudiendo identificarse una etapa inicial en la que aún se no ha desarrollado completamente la hidátide (ausencia de LL), y una segunda etapa que comienza con la aparición de la LL, en la que la hidátide se establece en el órgano blanco (infección crónica)^{50,51}. La etapa inicial ha sido estudiada en modelos de infección secundaria de ratones. En este contexto, se observa una fuerte respuesta inflamatoria, con componentes de las respuestas T_H1 y T_H17, que potencialmente es capaz de controlar la infección. Dicha respuesta se caracteriza por el reclutamiento de eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos, y por la activación del complemento^{52,53,54}.

Durante la etapa de infección crónica existe una respuesta inmunológica compleja, que posee componentes de respuestas de tipo T_H1 (IFN- γ , NO), T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) y T_{reg} (IL-10, TGF- β , LT FoxP3+)^{55,56}. Los alcances del componente regulador de la respuesta inducida por el metacestodo de *E. granulosus s. l.* han quedado de manifiesto en experimentos de transferencia de células de ganglio de ratones infectados, que son capaces de inhibir respuestas a antígenos no relacionados en ratones receptores⁵⁷. También han quedado en evidencia en modelos de asma, en los que la infección mejora la patología⁵⁸, y en modelos de cáncer, en los que la infección promueve la metástasis⁵⁹. Con respecto a la inmunidad humoral, entre la semana 2 y 11 se detectan anticuerpos específicos para moléculas presentes en el LH¹⁵. Aunque se encuentran anticuerpos de isotipo IgG, IgM e IgE, predominan las formas IgG1 e IgG4 asociándose esta última subclase a respuestas regulatorias en el contexto de respuestas T_H2⁶⁰. Si bien en principio los anticuerpos específicos podrían unirse al tegumento de la GL y activar la vía clásica del complemento, este mecanismo efector contra el parásito sería minimizado por el secuestro de C1q en la malla de la LL, particularmente por su interacción con los gránulos de InsP6.Ca, resultando en una activación abortiva del complemento sobre la LL, y evitando la activación sobre la GL⁶¹. El carácter abortivo de la activación sobre la LL se debería al menos en parte a que la LL también es capaz de unir factor H (FH), el principal factor regulador de la vía alternativa (amplificadora) de sistema complemento^{62,63}. En animales previamente inmunizados o expuestos

al parásito, los anticuerpos contra antígenos de las oncósferas (como Eg95) son fundamentales para la protección frente a un desafío con el parásito ⁶⁴.

Finalmente, estudios *in vitro* utilizando moléculas o estructuras del parásito sugieren varias actividades inmuno-reguladoras como: inhibición del reclutamiento de neutrófilos por la subunidad de 12 KDa del AgB⁶⁵, inducción de macrófagos con características de activación alternativa por la LL⁶⁶, inhibición de la proliferación de macrófagos por la LL⁵⁵, inducción de DC con fenotipos semi-maduros potencialmente tolerogénicos por la LL o el AgB^{67,68} e inhibición de la producción de NO por parte de macrófagos debida al estímulo con la LL^{69,70}. En resumen, el metacestodo de *E. granulosus s. l.* es capaz de modificar la respuesta inmune del hospedero induciendo respuestas reguladoras para garantizar su supervivencia mediante el condicionamiento de células del sistema inmune innato. Muchos de estos mecanismos, y su grado de contribución a la evasión del parásito de la respuesta inmune del hospedero, todavía se desconocen.

1.5.4. Células dendríticas en infecciones con helmintos

En la sección anterior se mencionaron las características principales de las respuestas inmunológicas a helmintos, pero ¿qué señales de los parásitos son decodificadas por el sistema inmune innato y, en particular, por las DC? Y más aún, ¿cómo ponen en marcha las DC las respuestas T_{H2} modificadas?

Las DC cumplen un rol clave en las respuestas inmunitarias en general, ya que constituyen el puente que conecta la respuesta inmune innata con la adaptativa. Su papel en las respuestas desencadenadas frente a la infección por helmintos no es la excepción a la regla, como lo demuestran experimentos de transferencia adoptiva de DC pulsadas con antígenos de helmintos, capaces de desencadenar respuestas T_{H2} específicas, y experimentos de depleción de DC, en los que no se desencadenan respuestas T_{H2} frente a *Schistosoma mansoni* y *Heligmosomoides polygyrus*^{71,72}.

Las DC reconocen a los patógenos, o a sus productos, y responden adoptando fenotipos capaces de inducir respuestas adaptativas acordes mediante la activación de LT. Sus funciones de reconocimiento están mediadas por un vasto repertorio de receptores, extra e intra-celulares.

Dentro de dichos receptores encontramos a los TLR (del inglés *Toll Like Receptors*), RLR (del inglés *RIG-I Like Receptor*), NLR (del inglés *NOD Like Receptors*), receptores basureros o *scavenger* y CLR (del inglés *C type Lectin Receptor*). Aunque los TLR han sido típicamente asociados a la activación de DC inductoras de respuestas de tipo T_H1/T_H17 ⁷³, se ha visto que los TLR 2, 3 y 4 pueden participar en el reconocimiento de moléculas provenientes de helmintos. Sin embargo, las respuestas T_H2 desencadenadas por células dendríticas en respuesta a la estimulación por SEA tiene lugar aún en ratones *Knock out* para la molécula adaptadora MyD88, principal encargada de activar al factor de transcripción NF κ B en respuesta a la unión de los TLR a sus ligandos⁷⁴. Por lo tanto, los TLR no parecen ser indispensables para la inducción de respuestas T_H2 ^{41,75,76}. Por su parte, se ha visto que, en las DC, los receptores CLR DC-SIGN (del inglés, *dendritic cell-specific intercelular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*), receptor de manosa y MGL (del inglés, *macrophage galactose-type lectin*) reconocen y median la internalización de glicoconjugados de un extracto de *S. mansoni*⁷⁶. De hecho, los glicoconjugados de helmintos parásitos han demostrado ser moléculas clave en el condicionamiento de DC y en la consecuente inducción de respuestas T_H2 ^{77,41}. Sin embargo, aún se desconocen las moléculas de helmintos que dan comienzo a la inducción de las respuestas T_H2 en muchos otros casos⁷⁸.

La inducción de las diferentes respuestas adaptativas por parte de las DC depende fuertemente de su estado de maduración. Históricamente, se han descrito dos estados de maduración fenotípica vinculados a diferentes funciones de las DC²⁶. Las DC maduras y activadas clásicamente ocurren como resultado del reconocimiento de PAMPs o DAMPs, y se caracterizan por expresar altos niveles de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 y por secretar citoquinas pro-inflamatorias (como IL-12p70, IL-6 e IL-1 β). Estas DC disminuyen sus capacidades fagocíticas y adquieren funciones inductoras de respuestas T efectoras, particularmente de tipo T_H1 . Por otra parte, las DC maduras no activadas (*i.e.* que no reconocen PAMPs o DAMPs), maduran espontáneamente expresando altos niveles de moléculas de MHC (unidos a péptidos propios) sin inducción de la expresión de moléculas co-estimuladoras y/o secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Estas DC tienen un papel clave en la anergización, depleción o inducción de LT_{reg} (por lo que se les ha atribuido un rol central en la inducción de tolerancia periférica²⁶).

Por otra parte, se ha visto que las DC estimuladas por moléculas o preparaciones provenientes de helmintos adquieren fenotipos intermedios entre los descritos como clásicamente activados y no activados. En otras palabras, los productos de helmintos inducen DC semi-maduras^{79,80}. En términos fenotípicos, las DC semi-maduras se caracterizan por la secreción de altos niveles de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , expresión baja/moderada de algunas de las moléculas co-estimuladoras y/o expresión de moléculas co-inhibitorias como PD-L1 o PD-L2⁸¹. En otros contextos, varios estudios relacionan los fenotipos semi-maduros de las DC con inducción de tolerancia periférica y supresión de respuestas inmunes^{82,83,84,81}. El ejemplo más estudiado de inducción de fenotipos semi-maduros en las DC por materiales de helmintos es el de estimulación de DC con materiales solubles de huevos de *S. mansoni* (SEA, del inglés *Schistosoma mansoni soluble egg antigens*). Dichas DC presentan niveles moderados de CD80, CD86, CD40 y MHC II, no producen cantidades cuantificables de IL-12, y no responden de forma clásica a la estimulación con LPS^{85,86}. Resultados similares se obtienen en DC estimuladas con productos de excreción/secreción (E/S) de *Brugia malayi*, *Trichinella spiralis* o *Taenia crassiceps*⁸⁷.

Los estudios sobre el fenotipo adquirido por DC *in vivo* en infecciones helmínticas señalan que las DC adquieren fenotipos de activación basales o “mínimos” caracterizados por expresión baja/moderada de moléculas co-estimuladoras^{88,89}. Por ejemplo, *Straw A. D. y cols. (2003)*⁹⁰ observaron un leve aumento en la expresión de CD80 y CD40 en DC provenientes de bazo de ratones infectados con *S. mansoni* en comparación con DC provenientes de ratones infectados con *T. gondii* (un parásito inductor de respuestas T_H1).

En suma, varios trabajos señalan la capacidad de los helmintos, o de sus materiales, para inducir fenotipos de activación mínimos, o semi-maduros, en las DC. Considerando el papel fundamental que cumplen las DC en la inducción de respuestas inmunológicas, dichos fenotipos podrían estar fuertemente vinculados con la evasión inmunológica observada en las infecciones helmínticas.

1.5.5. Condicionamiento de células dendríticas por el metacestodo de *E. granulosus s. l.*

Durante la infección con *E. granulosus s. l.*, las células del sistema inmune se enfrentan a una variedad de moléculas derivadas del parásito con potenciales efectos sobre su activación. En particular, las moléculas secretadas por el parásito y la superficie de la LL expuesta al medio interno del hospedero son los principales materiales parasitarios estudiados con respecto a sus efectos sobre el sistema inmune⁹¹.

El único análisis publicado sobre fenotipo de las DC *in vivo* en el contexto de la infección por *E. granulosus s. l.* es el de *Pan W. y cols. (2013)*⁵¹, en el que se analiza la infección crónica (al mes, 6 meses y 1 año post-infección) secundaria por *E. granulosus s. l.* en ratones Balb/c. Con las salvedades de que en dicho trabajo las DC son definidas únicamente cómo la población CD11c⁺ y sólo se estudian los niveles de expresión de CD86 y MHCII, los investigadores observaron que las DC de bazo o sangre de animales infectados presentan mayor expresión de CD86 y MHC-II en comparación con los ratones control.

Con respecto al condicionamiento de DC por moléculas secretadas por el parásito, *Rigano R. y cols. (2007)*⁶⁸ estudiaron los efectos sobre DC de una las principales moléculas antigénicas presentes en LH: el antígeno B (AgB). El AgB es una lipoproteína de 230 kDa capaz de atravesar la LL y llegar a los tejidos del hospedero. Dichos investigadores observaron que el AgB posee efectos sobre la maduración de DC humanas, promoviendo la secreción de IL-10 y la inducción de respuestas adaptativas caracterizadas por la secreción de IL-4.

Nuestro grupo se ha centrado en el estudio del fenotipo adquirido por las DC en respuesta al condicionamiento con la LL de *E. granulosus s. l.* El modelo de condicionamiento más cercano al que ocurre durante la infección implicaría el uso de porciones macroscópicas de LL. Sin embargo, en la práctica dicha aproximación es inviable debido a la imposibilidad de repartir en diferentes pocillos de cultivo porciones equivalentes, cuantitativa y cualitativamente, de LL. Así, hemos evaluado los efectos inmunológicos de una preparación particulada de LL, enriquecida en sus componentes mucínicos (pLL, del inglés *particulated Laminated layer*), sobre un modelo de DC (células clave en el inicio y regulación de las respuestas adaptativas) derivadas de médula ósea de ratón (BMDC, del inglés *bone marrow dendritic cells*). Dichas partículas intentan ser un modelo

de la descamación de la LL que ocurre durante la infección como consecuencia del crecimiento de la hidátide, mencionada en la sección 1.4. (Figura 1.5.5.1).

Como se verá más adelante, la preparación de pLL implica pasos de filtración de la suspensión por mallas de diferente tamaño de poro. Aunque, teóricamente, de esta forma podríamos obtener fracciones de partículas de tamaño definido, la naturaleza física de las partículas (con una dimensión mucho mayor a las otras dos y considerable flexibilidad) da lugar a la obtención de suspensiones con tamaños de partículas heterogéneos, que incluyen tamaños superiores al tamaño de poro del filtro y, obviamente, tamaños menores, que caen en el rango de lo teóricamente internalizable por una célula fagocítica (cual).

La estimulación de BMDC con pLL mostró que las partículas no inducen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12p70 o IL-12/23p40, TNF- α , IL-6 e IL-1- β) ni anti-inflamatorias (IL-10), mientras que sí se induce selectivamente la expresión de la molécula co-estimuladora CD86⁶⁷. Sin embargo, pLL es capaz de modificar la respuesta de las células a agonistas de TLR, como el LPS, inhibiendo la expresión de la molécula co-estimuladora CD40 y potenciando la de CD86, y sesgando la producción de citoquinas a favor de IL-10 y en contra de IL-12 (IL-12p70 o IL-12/23p40)⁶⁷. En otros sistemas biológicos, fenotipos similares a éste se han denominado semi-maduros y han sido asociados a la inducción de tolerancia^{82,83}. Cabe destacar que los efectos de pLL sobre las BMDC también se observan en macrófagos diferenciados *in vitro* en presencia de M-CSF⁶⁷.

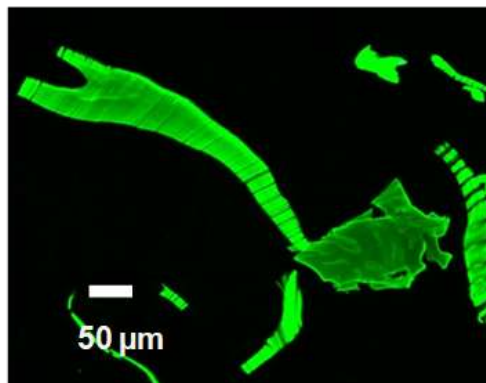


Figura 1.5.5. Microscopía de fluorescencia de partículas de pLL. Se muestran partículas de pLL. Las partículas fueron marcadas con una lectina (PNA, *Peanut agglutinin*) conjugada al fluorocromo FITC. Nótese las laminaciones características de la LL y la heterogeneidad de tamaño de la suspensión de partículas. PNA-FITC (verde): pLL. Fotografía de Cecilia Casaravilla.

Con respecto a la composición química de las partículas de LL, como ya se mencionó, la remoción previa de los gránulos de InsP6 no modifica la respuesta de las BMDC. Los carbohidratos tampoco mostraron estar involucrados en la inducción de los efectos de pLL sobre las DC, ya que su oxidación no altera la obtención del fenotipo semi-maduro. Los efectos de pLL tampoco fueron eliminados por la ruptura de los enlaces peptídicos mediante el tratamiento de las partículas con la proteasa “pronasa”. Estos resultados señalan que los efectos de pLL sobre BMDC no se deberían a agonistas moleculares presentes en las partículas⁶⁷. Por otro lado, resultados de nuestro grupo mostraron que la reducción de puentes disulfuro mediante el tratamiento con DTT facilita la solubilización de las partículas de pLL por ultrasonido⁹². Dicha reducción sí afecta los efectos de pLL sobre las BMDC observados, lo que sugiere a las propiedades supramoleculares de las partículas como responsables de los efectos sobre las BMDC⁶⁷.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

En este trabajo, nos propusimos profundizar en el estudio de los mecanismos que median los efectos de pLL sobre las BMDC y estudiar la funcionalidad de las BMDC condicionadas con este material del parásito, así como con otros más representativos de aquellos a los que se enfrenta el sistema inmune durante la infección. En este contexto, nos planteamos analizar los cambios generados en células dendríticas en modelos gradualmente más relevantes a la infección en hospederos naturales: estimulación *in vitro* con partículas de LL de tamaños mayores a los estudiados hasta el momento (es decir, tamaños enteramente en el rango no fagocitables), estimulación *in vitro* con microhidátides (a ser obtenidas *in vitro* por desarrollo a partir de psc, y que contemplarían los efectos de la LL y de los productos de E/S), e infección secundaria crónica en ratones.

2.2. Objetivos específicos

I. Optimizar la obtención y/o preparación de materiales parasitarios más representativos de aquellos a los que se enfrentan las células durante la infección, que incluyan los componentes expuestos por la hidátide, los secretados, o la suma de ambos. Esto es:

- a. preparar partículas de LL de tamaño no fagocitable.
- b. establecer en el laboratorio la metodología de obtención de microhidátides a partir del cultivo de psc.

II. Determinar los efectos de los materiales parasitarios mencionados en (I) sobre el fenotipo/respuesta de BMDC, usado como modelo de DC.

III. Evaluar la capacidad de BMDC condicionadas por los materiales preparados en (I), de afectar la respuesta *in vitro* de LT CD4⁺.

IV. Estudiar el fenotipo adquirido por las DC locales durante la infección crónica experimental con *E. granulosus s. l.*

V. Analizar la respuesta adaptativa inducida durante la infección crónica experimental con *E. granulosus s. l.*

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales de trabajo

3.1.1. Material parasitario

Trabajamos con paredes o psc de hidátides fértiles de *Echinococcus granulosus s. l.* obtenidas de pulmones bovinos infectados naturalmente. Dicho material fue cordialmente cedido por la empresa *Urexpert* de Montevideo.

El procesamiento de las hidátides implicó limpiarlas superficialmente con alcohol 70% (v/v), hacerles un pequeño corte con bisturí para extraer el LH y los psc y, finalmente, extraer la pared colapsada de la hidátide. Las paredes extraídas se lavaron dos veces con solución fisiológica (PBS, *phosphate buffered saline*) y se congelaron en PBS a -20 °C hasta ser utilizadas. Por su parte, el procesamiento de los psc se describe en detalle en la siguiente sección.

3.1.2. Ensayos de diferenciación de microhidátides a partir del cultivo *in vitro* de protoscólices de *E. granulosus s. l.*

Para obtener microhidátides a partir de psc de *E. granulosus s. l.* se ensayaron diferentes protocolos de diferenciación, de acuerdo a lo reportado previamente en la literatura^{4,93,94,95,96}. Se obtuvieron psc a partir de hidátides fértiles de pulmones bovinos como se describió en la 3.1.1. Brevemente, las vesículas prolíferas y psc provenientes de las hidátides se lavaron tres veces con PBS apirógeno. Luego, los psc contenidos en las vesículas se liberaron mediante pasaje por aguja de 21G de tres a cinco veces. La totalidad de los psc así obtenidos se lavó varias veces con PBS apirógeno para separar los parásitos vivos de los muertos (cuya decantación es más lenta que la de los psc vivos). Adicionalmente, los psc fueron lavados tres veces más con PBS 1 mg/ml glucosa y antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 0,25 µg/mL de anfotericina B) (PBS Dulbecco's), previo a ser contados utilizando eosina como indicador de viabilidad. Inicialmente, los parásitos se cultivaron a una concentración de 100 psc/ml en dos

tipos de medio de cultivo: monofásico y bifásico. Además, se ensayaron dos estados de los psc: activados y sin activar. Para el medio de cultivo monofásico se utilizó 1.5 ml/pocillo de medio DMEM suplementado con 10 mM HEPES, 4 mg/ml glucosa, 10% ml SFB (v/v) y antibiótico/antimicótico, en placa de 12 pocillos de fondo plano. Para preparar el medio bifásico se coaguló 0.5 ml/ pocillo de suero de ternero recién nacido (NBCS, del inglés *Newborn Calf Serum*) durante 1 hora a 75 °C, en placas de 12 pocillos de fondo plano. Al suero coagulado se le adicionó 1 ml de una fase líquida compuesta por medio RPMI 1640 suplementado con 0.45% (p/v) glucosa, 0.45% (p/v) extracto de levadura, 20% SFB (v/v), y antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0,25 µg/mL de anfotericina B). La activación de los psc se realizó en una solución de agua apirógena conteniendo 1% (p/v) pepsina, 0.85% (p/v) NaCl, pH 4, durante 30 minutos en baño a 37 °C. Los psc no activados fueron puestos en cultivo luego de ser lavados con PBS apirógeno. En todos los casos, los parásitos se mantuvieron en cultivo hasta un máximo de un mes, con cambios de la mitad del medio líquido cada tres días.

Los resultados negativos para la obtención de microhidátides según los protocolos anteriores nos condujeron a ensayar otras condiciones de cultivo siguiendo la bibliografía. Así, también ensayamos las condiciones descritas por *Rogan M. T. & Richards K. S. (1986)*⁹⁴ en las que se cultivan 50 vesículas prolíferas/ml en medio DMEM suplementado con 20% (v/v) SFB, las descritas por *Cucher M. y cols. (2013)*⁴, en el que se cultivan 200 psc/ml en medio DMEM suplementado con 4 mg/ml glucosa y 10% (v/v) NBCS, y el protocolo descrito por *Hemer S. y cols. (2014)*⁹⁵ en el que se cultivan 200 psc/ml de medio DMEM suplementado con 10 nM insulina y 10% (v/v) SFB.

3.1.3. Obtención de un pulverizado fino de capa laminar

Las paredes hidáticas previamente congeladas se descongelaron y lavaron cinco veces con PBS. El excedente de PBS se escurrió sobre papel de filtro y se determinó la masa húmeda del material, para luego realizar dos lavados más, uno de 3 y otro de 24 horas, con PBS a razón de 10 ml/g de masa húmeda. Luego se realizaron dos lavados idénticos a los anteriores, pero con NaCl 2 M, con el fin de minimizar la presencia de proteínas no estructurales en la muestra, que

normalmente provienen del hospedero y se adsorben a la LL de la hidátide durante la infección. Finalmente, las paredes se sometieron a varios lavados rápidos con agua destilada para remover el exceso de sales introducidas en el paso anterior. El material se congeló a -80 °C en un volumen mínimo de agua y se liofilizó toda la noche. El liofilizado se molió en mortero, se pulverizó finamente entre dos vidrios esmerilados y se guardó a 4 °C hasta su uso.

Los pasos que siguen se realizaron en condiciones de esterilidad (flujo laminar). Se resuspendió el pulverizado en PBS 30 mM EDTA, apirógeno, a razón de 2 mg de masa seca/ml de solución. El tratamiento con EDTA se realizó con el fin de remover los gránulos de InsP6.Ca. Para resuspender el material pulverizado se utilizó un homogeneizador tipo “Potter” lavado previamente con NaOH 0.1 M durante toda la noche (para disminuir los niveles de LPS contaminante) y autoclavado. La suspensión obtenida se filtró secuencialmente por mallas de serigrafía autoclavadas de tamaños de poro 85 µm, 45 µm, 32 µm y 23 µm. Para eliminar eventuales contaminantes pirógenos, las diferentes fracciones de partículas obtenidas se lavaron 10 veces con PBS apirógeno, a razón de 10 ml de PBS/ml de *pellet* de material, mediante centrifugaciones sucesivas a 3500g durante 5 minutos cada vez. Por último, se resuspendieron las fracciones en un volumen conocido de PBS apirógeno, y se determinó la concentración de la suspensión, en términos de masa seca, por liofilización de una alícuota (previamente lavada con agua destilada para eliminar las sales) y masado por diferencia. La fracción filtrada a través de la malla de 23 µm se llamó **pLL** (del inglés *particulate Laminated Layer*). Este protocolo de obtención de pLL fue puesto a punto en Casaravilla C. et al., 2014⁶⁷. En dicho trabajo también se validó el protocolo en cuanto a que los niveles de endotoxinas presentes, una vez que el material se lleva a la concentración de uso, no fueran mayores a los límites aceptados para cultivo de células.

En el presente trabajo se puso a punto la obtención de partículas de LL de tamaño no fagocitable (**pLL^{NP}**; del inglés *non phagocyttable particulate Laminated Layer*). Para ello, al protocolo previamente descrito se le añadió un paso intermedio de lavado exhaustivo del material retenido en la malla de 32 µm de forma de eliminar las partículas de tamaño menor que el poro de la malla. En la práctica, dicha fracción se lavó con un litro de PBS apirógeno a medida que era filtrada. La ausencia de partículas pequeñas en dicha fracción se corroboró por microscopía de campo claro.

Todas las preparaciones de LL se conservaron a 4 °C en PBS apirógeno suplementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) y antimicótico (0.25 µg/ml de anfotericina B).

La ausencia de endotoxinas en cada preparación de pLL o pLL^{NP} se controló en términos de ausencia de producción de IL-12p40 en cultivos de BMDC.

3.1.4. Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea

Para la diferenciación de BMDC se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de 8 – 12 semanas de edad, provistas por la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del *Institut Pasteur* de Montevideo. El protocolo de diferenciación utilizado fue descrito por *Lutz M. B., et al. 1999*⁹⁷ y fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), protocolo N° 230.

Los animales se sometieron a eutanasia utilizando el anestésico inhalatorio Isoflurano. Se realizó la disección de las patas traseras y se extrajeron los fémures y las tibias. Los huesos obtenidos se limpiaron de restos de tejido y se embebieron en alcohol 70% (v/v) durante 2-3 minutos. Los pasos subsiguientes se realizaron en condiciones de esterilidad. Se retiró el alcohol y los huesos se lavaron dos veces con PBS frío. Para extraer la médula ósea se cortaron las epífisis, y los huesos se perfundieron con 3 ml de PBS frío utilizando una jeringa de 5 ml con una aguja de 24G. La médula así obtenida se disgregó haciéndola pasar 2-3 veces por la aguja de la jeringa. Las células recuperadas se contaron en cámara de Neubauer utilizando el indicador de viabilidad Trypan Blue al 0.1% (m/v). El volumen de suspensión celular correspondiente a 3×10^6 precursores de médula ósea se sembró en el centro de una placa de Petri (formando una “nube” compacta de células) conteniendo 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 mM HEPES, antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 0,25 µg/mL de anfotericina B), 10% (v/v) Suero Fetal Bovino inactivado por calor (SFB) y 20 ng/mL del factor de diferenciación de células dendríticas GM-CSF (proteína recombinante, Peprotech) o 1% (v/v) de sobrenadante del cultivo de células de plasmocitoma J558, productoras de GM-CSF. Dicho sobrenadante, enriquecido en GM-CSF, se produjo en el laboratorio siguiendo el protocolo

descrito en *Rayasam A. (2015)*⁹⁸ y se optimizó el porcentaje a utilizar para la diferenciación de las células. El medio de cultivo compuesto como se detalló antes se denominó “medio completo”. Las condiciones de incubación utilizadas en este caso, y en el resto de este trabajo, fueron: temperatura de 37 °C con atmósfera de 5% (v/v) de CO₂.

Los cambios de medio se realizaron como se describe a continuación: al tercer día de cultivo se agregaron 10 ml de medio completo a cada placa de Petri (volumen final 20 ml), a los seis días se removieron 9 ml del medio de cultivo y se agregaron 10 ml de medio completo fresco. Dos días después (octavo día de cultivo) se repitió este último procedimiento. Todos los agregados/cambios de medio se hicieron suavemente con el fin de minimizar la activación de las células, altamente sensibles a estímulos mecánicos. A los 10 días de diferenciación las células se cosecharon, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, y se resuspendieron en medio completo, esta vez conteniendo 5 ng/ml de GM-CSF comercial o 0.25% (v/v) de sobrenadante de las células J558 (“medio de trabajo”). Las células se contaron en cámara de Neubauer utilizando Trypan blue al 0.1% (m/v) como indicador de viabilidad y se sembraron a razón de 0.4x10⁶ células/pocillo de placa de 96 pocillos, 1x10⁶ células/pocillo de placa de 48 pocillos o 2x10⁶ células/pocillo de placa de 24 pocillos, todas ellas de fondo plano.

3.2. Experimentos *in vitro*

3.2.1. Separación de las BMDC de pLL^{NP}

La utilización de partículas de pLL de tamaño no fagocitable permitió poner a punto dos protocolos de separación de las partículas de las BMDC. Inicialmente la separación se llevó a cabo por decantación diferencial en el tiempo de las células y las partículas. Las células junto con las partículas se resuspendieron por pipeteo en el volumen original de cultivo, se colocaron en un tubo y se agitaron en “*vórtex*” suavemente. El tubo se dejó en hielo 3 minutos y se procedió a retirar con pipeta el material decantado, enriquecido en partículas grandes. El procedimiento se repitió dos veces. Si bien este método permitió separar las células de las partículas de rápida decantación, no fue eficaz para separarlas de las partículas más pequeñas, cuya decantación

suponía esperar más tiempo y aumentar así el número de BMDC perdidas en cada ronda de separación. Incluso después de varias rondas de separación, y de tiempos de espera mayores, no se logró separar por completo a las células de las partículas. Sin embargo, este procedimiento fue útil, y el de elección, cuando el objetivo era analizar el fenotipo de las BMDC por citometría de flujo, ya que permitía eliminar rápidamente las partículas grandes que podrían causar problemas a la hora de la adquisición de la muestra por el citómetro.

En los casos en los que era preciso obtener las células exentas de partículas de pLL^{NP} el método de separación utilizado fue la filtración. Este procedimiento se siguió cuando las BMDC debían seguir manteniéndose en cultivo, por lo que la manipulación se llevó a cabo en esterilidad y en hielo, para evitar alteraciones del fenotipo celular debido el estrés mecánico de la manipulación. Las células se resuspendieron por pipeteo suave en su volumen original de cultivo y se pasaron a un tubo. Luego se filtraron utilizando una jeringa acoplada a un portafiltro con una malla de 23 μm de corte. Como vehículo para la filtración se utilizó medio de trabajo a razón de 10 ml/ 4×10^6 BMDC. Se utilizó un mismo juego de portafiltro/malla/jeringa por condición experimental ensayada y se tuvo cuidado de hidratar las mallas previo a su primer uso. Las células filtradas se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, a 4 °C, y luego se resuspendieron en medio de trabajo. Las células se contaron en cámara de Neubauer con Trypan blue al 0.1% (m/v) como indicador de viabilidad, se llevaron a la concentración deseada y se sembraron. Cabe destacar que este procedimiento implica la dilución de los estímulos solubles y posterior eliminación en el sobrenadante de centrifugación, por lo que todos los estímulos, solubles y particulados, son retirados cuando se sigue este protocolo.

3.2.2. Estudio de la inducción del fenotipo semi-maduro por pLL^{NP} en BMDC luego de 18 horas de contacto

Para el estudio del fenotipo inducido por pLL^{NP} en las BMDC se sembraron 0.4×10^6 células (en 100 μl) en placas de 96 pocillos de fondo plano utilizando medio de trabajo. Los estímulos fueron preparados en medio de trabajo y agregados al cuádruple de su concentración (4X, cuando correspondía) en 50 μl de medio de trabajo, 30 minutos después de sembrar las células

(volumen final 200 μ l). Se probaron diferentes dosis de pLL^{NP} (7.5, 25, 75 y 150 μ g/1x10⁶ células) seleccionándose para estimular a las células la dosis de pLL^{NP} de 75 μ g/1x10⁶ células por inducir efectos similares a los encontrados con pLL (25 μ g/1x10⁶ células) y no afectar la viabilidad celular. El orden de agregado de los estímulos fue: medio de trabajo, pLL^{NP} (75 μ g/1x10⁶ células) y LPS (10 ng/ml). El cultivo se incubó durante 18 horas. Se retiró el sobrenadante de cultivo para ser analizado por ELISA (IL-10 e IL-12p70), y las células, mantenidas en hielo, se separaron de las partículas por el método de decantación diferencial en el tiempo antes descrito. Luego, se estudió el fenotipo de las BMDC por citometría de flujo (sección 3.4.1).

3.2.3. Estudio de la inducción del fenotipo semi-maduro por pLL^{NP} en BMDC luego de 3 horas de contacto y 18 horas sin contacto

Para evaluar la necesidad de contacto continuo entre las células y las partículas para la inducción del fenotipo semi-maduro se siguió la siguiente estrategia experimental. Se sembraron 2x10⁶ células/pocillo de placa de 24 pocillos de fondo plano utilizando medio de trabajo (en 500 μ l), y se estimularon, luego de 30 minutos con 250 μ l de los estímulos (4X): medio de trabajo, pLL^{NP} (75 μ g/1x10⁶ células), LPS (10 ng/ml) o pLL^{NP}/LPS, durante 3 horas (volumen final 1 ml). A tiempo cumplido, el cultivo se mantuvo en hielo y se continuó trabajando en condiciones de esterilidad. Las células se resuspendieron por pipeteo suave, se separaron por filtración a través de una malla de 23 μ m de poro (sección 3.1.2.1), se contaron y se volvieron a resuspender en el volumen deseado. Una proporción de las BMDC separadas de los estímulos se utilizaron para estudiar el fenotipo adquirido luego de 3 horas de incubación con los mismos. Otra parte de las células se sembró en placa de 96 pocillos de fondo plano utilizando el número usual de células por pocillo (0.4x10⁶) y se cultivaron en ausencia de estímulos durante 18 horas más (200 μ l volumen final). Para ambos tiempos se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo para analizar citoquinas por ELISA y se estudiaron las células por citometría de flujo.

En paralelo a los tratamientos antes descritos, se sembraron BMDC en las condiciones usuales (18 horas con los estímulos; ver sección anterior), como control del fenotipo esperado.

3.2.4. Estudio de la necesidad de contacto célula-partícula para la inducción del fenotipo semi-maduro en BMDC

Para evaluar la presencia de mediadores difusibles liberados por las BMDC condicionadas por el contacto con pLL que tengan efectos sobre BMDC que no contactan las partículas se utilizó el sistema de insertos *trans-well* (Corning, #3413 C48). Dicho sistema se basa en la compartimentalización del pocillo de una placa de 24 pocillos de fondo plano, en un compartimento superior y uno inferior separados entre sí por una membrana de policarbonato de tamaño de poro 0.4 μm que permite el intercambio de mediadores difusibles entre los compartimentos. Se sembraron 2×10^6 BMDC por pocillo, a los 30 minutos se agregó pLL (25 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ de células), 30 minutos después se colocaron los insertos *trans-well* y en ellos 0.34×10^6 BMDC (valor calculado en función del área del inserto para que la densidad de células sea igual a la de los pocillos). Finalmente, se agregó LPS (10 ng/ml) o medio solamente, cuidando de agregar el volumen final dividido entre ambos compartimentos de forma proporcional al número de células, con el fin de evitar que la eventual formación de micelas afecte la difusión del LPS entre los compartimentos y, con ello, la distribución homogénea del estímulo. Luego de 18 horas de incubación, la placa de cultivo se colocó en hielo, los insertos *trans-well* se pasaron a pocillos vacíos, y las células de ambos compartimentos se resuspendieron por pipeteo suave para ser analizadas por citometría de flujo.

3.2.5. Ensayos de bloqueo de IL-10

Para evaluar el efecto del bloqueo de la actividad biológica de la IL-10 se sembraron 0.4×10^6 células en placas de 96 pocillos de fondo plano utilizando medio de trabajo y se estimularon luego de 30 minutos con pLL (25 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células), LPS (10 ng/ml) o pLL/LPS, en ausencia de anticuerpos, en presencia de un anticuerpo bloqueante de la actividad biológica de la IL-10 (*eBioscience*, clon JES5-16E3, IgG2b de rata, kappa, #14-7101, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o en presencia de un anticuerpo control isotípico (*BD*, IgG2b de rata, kappa #553985, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), durante 18 horas. A tiempo cumplido se retiró el sobrenadante para analizar citoquinas por ELISA, y las células se procesaron para ser estudiadas por citometría de flujo.

3.2.6. Ensayos utilizando inhibidores de la dinámica del citoesqueleto de actina y de la señalización a través de PI3K de clase I

Para estudiar el papel de la dinámica del citoesqueleto de actina y de la señalización a través de PI3K de clase I en la inducción del fenotipo semi-maduro por pLL^{NP} se sembraron 0.4×10^6 células por pocillo de placa de 96 pocillos de fondo plano utilizando medio de trabajo. Las células se dejaron decantar 30 minutos y luego se las incubó durante 30 minutos con el inhibidor de la polimerización de actina citocalasina D (Cyt D, 5 μM), con el inhibidor de PI3K de clase I GDC 0941 (5 μM), con el inhibidor de Syk Piceatanol (25 μM) o con el vehículo de dichos estímulos, dimetilsulfóxido (DMSO, 70 μM). Luego, las BMDC se estimularon con pLL (25 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células), LPS (10 ng/ml) o pLL/LPS y se incubaron durante 18 horas. A tiempo final, las células se colocaron en hielo, se retiró el sobrenadante para analizar citoquinas por ELISA, y las BMDC se procesaron para ser estudiadas por citometría de flujo.

3.2.7. Ensayos de reacción linfocitaria mixta

Para realizar los ensayos de reacción linfocitaria mixta (MLR, del inglés *mixed lymphocyte reaction*) se diferenciaron BMDC a partir de ratones C57BL/6 y se sembraron 2×10^6 células por pocillo de placas de 24 pocillos de fondo plano. Se dejaron decantar durante 30 minutos y se estimularon con pLL^{NP} (75 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células), LPS (10 ng/ml), o pLL^{NP}+LPS, durante 3 horas. A tiempo cumplido las BMDC se resuspendieron suavemente por pipeteo en el volumen original de cultivo y se filtraron a través de una malla de 23 μm como se indica en la sección 3.2.1. Las BMDC separadas de los estímulos se contaron y sembraron 12.500 células por pocillo de placa de 96 pocillos de fondo en U. Paralelamente, se purificaron LT CD4⁺ de 1 o 2 ratones BALB/c siguiendo el protocolo indicado por el proveedor en el *kit* de purificación *Dynabeads Untouched Mouse CD4 Cells* (Invitrogen, # 11415D, 114116D). A los 30 minutos de sembradas las BMDC se agregaron 0.25×10^6 LT CD4⁺ por pocillo (relación 1:20, BMDC: LT CD4⁺), en medio RPMI 10% v/v SFB suplementado con piruvato y 2-mercaptoetanol (concentración final 1 mM y 55 μM , respectivamente), pipeteando tres veces para optimizar el mezclado entre los LT CD4⁺ y las BMDC. Los co-cultivos se incubaron durante 5 días, momento en el que se retiraron los sobrenadantes de cultivo para analizar citoquinas por ELISA.

3.3. Experimentos *in vivo* y *ex vivo*

3.3.1. Ensayos de infección secundaria con *Echinococcus granulosus s. l.*

Los experimentos de infección se realizaron utilizando ratones hembra C57BL/6 provistos por el laboratorio de cría de ratones de la División de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DILAVE, MGAP). Los animales, de 8-12 semanas de edad, se infectaron vía intraperitoneal con 2000 psc extraídos de hidátides fértiles provenientes de pulmones bovinos infectados (sección 3.1.1). Como se describió en la Sección 3.1.2, las vesículas prolíferas y psc provenientes de las hidátides se lavaron tres veces con PBS apirógeno. Luego, los psc contenidos en las vesículas se liberaron mediante pasaje por aguja de 21G de tres a cinco

veces. La totalidad de los psc así obtenidos se lavaron varias veces con PBS apirógeno para separar los parásitos vivos de los muertos (cuya decantación es más lenta que la de los psc vivos) y luego se contaron utilizando eosina como indicador de viabilidad. Posteriormente, los parásitos se resuspendieron de modo de inyectar 2000 psc en 200 μ l de PBS apirógeno. Sólo se utilizaron aquellos lotes de parásitos con viabilidad igual o mayor al 95%. Como control negativo, se inyectó un grupo de ratones con el mismo volumen de PBS apirógeno. Todas las preparaciones fueron inoculadas por vía intraperitoneal utilizando una aguja de calibre 23G. Los animales control fueron marcados en las orejas con sacabocado, y ambos grupos de ratones (control e infectados) fueron mantenidos en las mismas cajas, con viruta autoclavada y con tapas con filtro. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Higiene durante 6 meses sin restricciones en la cantidad de comida o agua provistas. Vale aclarar que el número de animales por grupo varió entre los experimentos, pero nunca fue menor a 4 ratones por grupo.

A tiempo cumplido los ratones se sometieron a eutanasia utilizando el anestésico inhalatorio isoflurano. Se realizaron 3 lavados peritoneales (1 + 5 + 5 ml) con medio RPMI 1640 (Sigma #R6504) suplementado con 10 mM HEPES, antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y 0,25 μ g/mL de anfotericina B) y 0.2 % (v/v) de SFB inactivado por calor. Las células recuperadas en los lavados se analizaron por citometría de flujo (secciones 3.4.1 y 3.4.2) y se midieron diversas citoquinas en el líquido recuperado del primer lavado peritoneal por ELISA (sección 3.4.5). Aquellos ratones que no albergaban hidátides detectables en cavidad peritoneal al momento de la eutanasia no se tomaron en cuenta para el estudio.

Por otra parte, se extrajeron los ganglios mesentéricos y bazos de cada animal. Para obtener las células en suspensión, las muestras fueron disgregadas entre dos mallas de serigrafía utilizando 4 ml del medio RPMI antes descrito. Todas las células se contaron utilizando Trypan blue al 0.1% (m/v) como indicador de viabilidad. En el caso de los ganglios mesentéricos se separaron 0.3×10^6 células para ser analizadas por citometría de flujo (secciones 3.4.1. y 3.4.2) y 1×10^6 células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo en U, en medio RPMI 10% v/v SFB suplementado con piruvato y 2-mercaptoetanol (concentraciones finales 1 mM y 55 μ M, respectivamente) (medio de re-estimulación), para ser re-estimuladas *in vitro*. En el caso de las

células de bazo, se lisaron los eritrocitos durante 3 minutos utilizando 3 ml/bazo de NH_4Cl 0.168 M. Los esplenocitos se contaron utilizando Trypan blue al 0.1 % (m/v) y se sembraron utilizando el medio de re-estimulación a razón de 2×10^6 células por pocillo de placa de 96 pocillos de fondo plano para ser re-estimuladas *in vitro*. Los estímulos utilizados fueron: pLL (20 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células), líquido hidático (LH, proveniente de hidátides fértiles de pulmón bovino), o pLL+LH. En estos ensayos también se utilizó LPS para evidenciar posibles efectos del LH debidos a la presencia de contaminantes bacterianos adquiridos durante su proceso de obtención a partir de las hidátides (resultados no mostrados). Antes del ensayo, el LH se concentró 10 veces por centrifugación en tubos Centricon (Millipore, 100kDa de tamaño de corte), para ser agregado a los pocillos de re-estimulación en una dilución final 1:1 (v/v) en relación al LH original. A los tres días de incubación los cultivos se colocaron en hielo y se retiraron los sobrenadantes para analizar el contenido de citoquinas por ELISA (sección 3.4.5).

3.4. Técnicas de análisis

3.4.1. Tinciones de marcadores de superficie celular

Para ser analizadas por citometría de flujo, las células se distribuyeron en pocillos de placas de citometría de 96 pocillos de fondo en V, y se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. El número de células por pocillo varió dependiendo del porcentaje del tipo celular a estudiar en la muestra, y del número de células total disponible para cada tipo de muestra. Así, se distribuyeron entre 0.3 y 0.4×10^6 BMDC/pocillo, 0.3×10^6 células de ganglio mesentérico/pocillo o, 1×10^6 esplenocitos/pocillo. Una vez en la placa, las células se lavaron una vez con 150 μl de PBS/pocillo y se centrifugaron a 300g durante 5 minutos a 4 °C, cada vez. Luego de cada centrifugación se descartaron los sobrenadantes por inversión de la placa y las células se disgregaron por agitación de la placa en “*vórtex*”.

Posteriormente, las células se incubaron con 25 μl de una solución de PBS conteniendo 0.1% (m/v) seroalbúmina bovina (BSA), 2 mM EDTA, pH 7.1 (FACS *buffer*) conteniendo 10% (v/v) de Suero Normal de Rata (SNR) durante 20 minutos. Este paso se realiza para bloquear la unión

inespecífica de los anticuerpos, por ejemplo, a los receptores Fc de las células. A continuación, se agregó una mezcla de anticuerpos conjugados a fluorocromos, específicos para los antígenos de interés, diluidos en FACS *buffer*, durante 30 minutos. De aquí en adelante las células se protegieron de la luz. En paralelo, se incubaron células de los diferentes tratamientos experimentales con una mezcla de anticuerpos conteniendo los controles de isotipo o con mezclas de todos los anticuerpos menos uno (control FMO, del inglés *fluorescence minus one*), para evidenciar, respectivamente, la unión inespecífica de los anticuerpos debida al isotipo de anticuerpo usado o, la interferencia de fluorescencia de los fluorocromos usados en un detector de fluorescencia particular. Al término de la incubación las células se lavaron nuevamente con FACS *buffer* en las condiciones antes mencionadas, se resuspendieron en 100 μ l de FACS *buffer* y se les agregó el marcador de viabilidad To-Pro 3 (sección 3.4.3.) previo a ser analizadas en un citómetro de flujo BD FACS Canto II de 8 detectores. Los datos obtenidos se analizaron posteriormente utilizando el programa *Flowjo* versión 7.6.2.

En los casos en los que las células no se midieron en un lapso corto de tiempo (células frescas), se procedió a fijarlas incubándolas con PBS conteniendo 2% m/v de paraformaldehído (PFA) durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. A tiempo cumplido, las células se lavaron dos veces con FACS *buffer* y se mantuvieron en 100 μ l de dicha solución a 4 °C hasta su análisis. En estas oportunidades la sonda de viabilidad utilizada, compatible con la fijación, fue *Live/Dead Green* o *far Red* (L/D) (sección 3.4.3).

Marcado	Antígeno	Fluorocromo	Dilución	Clon
Superficie	CD40	FITC	1/100	3/23
	CD86	PE	1/200	GL1
	CD80	PE	1/100	16-10A1
	MHC II	PerCP	1/300	I-A/I-E
	CD8a	PerCP-Cy 5.5	1/100	53-6.7
	CD11c	PECy7	1/200	N418
	TCR β	PECy7	1/200	H57-597
	PD-L1	APC	1/200	AF598
	CD4	APC-Cy7	1/400	GK 1.5
	CD19	APC-Cy7	1/200	1 D3
Intracelular	FoxP3	PE	1/100	FJK-165
Viabilidad	L/D	*Green o far Red	1/500	---
	To-Pro 3	*Far Red	1/1000	---

Tabla 3.4.1. Anticuerpos y sondas de viabilidad utilizados en citometría de flujo

Se detallan los anticuerpos y sondas fluorescentes utilizadas en citometría de flujo, junto con su dilución de trabajo (final). APC= alofocianina; Cy7= cianina 7; FITC= isotiocianato de fluoresceína; PE= ficoeritrina; PerCP= *Perinidin Chlorophyll Protein*, L/D= *live/dead*. * Tipo de fluorescencia.

3.4.2. Marcado del factor de transcripción FoxP3

Para el análisis por citometría de flujo de componentes intracelulares se distribuyeron las células en placas de fondo en V como se describe en la sección anterior. Como los protocolos de tinción intracelular implican pasos de fijación y permeabilización de las células, para la evaluación de la viabilidad se utilizó una de las sondas de L/D disponibles en el laboratorio (Tabla 3.4.1 y sección 3.4.3). Pevio a la incubación con L/D las células se lavaron dos veces con PBS, y luego se incubaron con 10 μ l/pocillo de una dilución 1/500 de la sonda en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Las células comenzaron a ser protegidas de la luz desde este paso. Luego se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas, agregando 15 μ l/pocillo de una solución de bloqueo conteniendo 16% (v/v) SNR en las condiciones antes mencionadas. Posteriormente, se marcaron los componentes de superficie celular como se describió en la sección 3.4.1 terminando con dos lavados con FACS *buffer*. Para los pasos de tinción intracelular que siguen se utilizó el *kit Foxp3 Staining Buffer Set* (eBioscience #00-5523-00). Las células se incubaron con 100 μ l de la solución de fijación/permeabilización del *kit* (preparada de acuerdo a

las instrucciones del fabricante), durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las células se lavaron dos veces con *buffer* de permeabilización del *kit* (preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante) y se incubaron con 50 µl del anticuerpo específico contra FoxP3 diluido en el mismo *buffer* (Tabla 3.4.1), durante 30 minutos en hielo y oscuridad. Finalmente, se realizaron dos lavados con el *buffer* de permeabilización, las células se resuspendieron en 100 µl de FACS *buffer* y se mantuvieron en hielo y oscuridad hasta su medición en el citómetro de flujo. En el caso de los controles FMO también se realizó el marcado de superficie celular, pero, a diferencia de lo que se describe antes, las células no se incubaron con el anticuerpo contra FoxP3, sino que con igual volumen de *buffer* de permeabilización solamente.

3.4.3. Tinciones con sondas de viabilidad

La base del funcionamiento de la sonda de viabilidad To-Pro3 es su incapacidad de penetrar la membrana íntegra de células viables. Así pues, la sonda ingresa en células cuyas membranas están comprometidas, como en el caso de células muertas, y se une al ADN emitiendo fluorescencia, por lo que las células marcadas se consideran muertas. En la práctica, las células frescas se incubaron al menos 5 minutos con 24 nM de To-Pro3/pocillo previo a ser analizadas en el citómetro de flujo.

Por su parte, la sonda de viabilidad *L/D* se une a poliaminas celulares y fluoresce. Cuando la membrana celular está íntegra, la sonda sólo se une a las poliaminas de la superficie celular y fluoresce con baja intensidad mientras que, si la misma está comprometida, la sonda ingresa al citosol y se une a las poliaminas intracelulares fluoresciendo con mayor intensidad. De esta forma, las células con mayor intensidad de fluorescencia se consideran muertas. Vale aclarar que, la unión de la sonda a su blanco es covalente, por lo que los posteriores tratamientos (como la fijación y la permeabilización) no alteran la señal debida a su unión.

3.4.4. Cuantificación de citoquinas en solución mediante ELISA

Para determinar la concentración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo se utilizó la técnica de ELISA (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*) en su modalidad de captura. Los pasos generales seguidos para medir las diferentes citoquinas se enumeran a continuación. Primero se sensibilizaron placas de ELISA *Nunc Maxisorp* con 50 μ l/pocillo de anticuerpo de captura diluido en el *buffer* correspondiente durante toda la noche a 4 °C. Segundo, se bloquearon los pocillos con 100 μ l de una solución de PBS conteniendo 10% (v/v) SFB, o 1% (m/v) BSA (según indicaciones de fabricante o puesta a punto previa realizada en el laboratorio) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tercero, se incubaron los pocillos con 50 μ l de las muestras (a la dilución correspondiente) o con diluciones seriadas de la solución estándar correspondiente durante 2-4 horas a temperatura ambiente o, toda la noche a 4°C (según indicaciones del fabricante). Cuarto, se incubaron los pocillos con 50 μ l de un anticuerpo de detección biotinilado durante 2 horas a temperatura ambiente. Quinto, se incubaron los pocillos con 50 μ l de streptavidina conjugada a la enzima peroxidasa. Luego de cada incubación la placa se lavó con una solución de PBS conteniendo 0.05% (m/v) Tween-20. El desarrollo de color se logró luego del agregado de 100 μ L de una solución de tetrametilbencidina (TMB) y H₂O₂ 0.01% (v/v) en una solución de citrato-fosfato 0.5 M, pH 5. La reacción colorimétrica se detuvo por el agregado de 50 μ l por pocillo de una solución de H₂SO₄ 0.3 M y se midió la absorbancia a 450 nm.

Los anticuerpos utilizados, así como su dilución en los respectivos *buffers* se indican en las Tablas 3.4.5. (a), (b) y (c).

Citoquina	Anticuerpo de captura		
	Conc. final ($\mu\text{g/mL}$)	Buffer	Marca y #catálogo
IFN γ	2	0,1M NaHCO ₃ pH 9,6	Producción propia UoE
IL-4	*	0,1M NaHCO ₃ pH 9,5	BD # 51-26511E
IL-5	*	0,1M NaHCO ₃ pH 9,5	BD # 51-26521E
IL-6	*	PBS	R&D # 840171
IL-10	*	0,2 M Na ₂ HPO ₄ pH 6,5	BD # 51-26571E
IL-10	*	PBS	R&D # 840125
IL-12p40	2	0,2 M Na ₂ HPO ₄ pH 6,5	BD # 551219
IL-12p70	*	0,2 M Na ₂ HPO ₄ pH 6,5	BD # 51-26611E
IL-13	*	PBS	R&D # 840249
IL-17	*	PBS	R&D # 840525
IL-1 β	*	0,1M NaHCO ₃ pH 9,5	BD # 51-26661E

Tabla 3.4.4. (a) Reactivos utilizados para medición de citoquinas por ELISA. Ver descripción de la tabla en la parte (c).

Citoquina	Estándar		
	Conc. inicial de la curva (ng/mL)	Buffer	Marca y #catálogo
IFN γ	50	PBS 10% SFB	Peptotech #315-05
IL-4	0.5	PBS 10% SFB	BD # 51- 26516E
IL-5	4	PBS 10% SFB	BD # 51-26526E
IL-6	1	PBS 1% BSA	R&D # 840173
IL-10	4	PBS 10% SFB	BD # 51- 265756E
IL-10	4	PBS 1% BSA	R&D # 840127
IL-12p40	20	PBS 10% SFB	PeProtech # 210-12P40H
IL-12p70	4	PBS 10% SFB	BD # 51-26616E
IL-13	4	PBS 1% BSA	R&D # 840251
IL-17	1	PBS 1% BSA	R&D # 840527
IL-1 β	2	PBS 10% SFB	BD # 51 - 26666E

Tabla 3.4.4. (b) Reactivos utilizados para medición de citoquinas por ELISA. Ver descripción de la tabla en la parte (c).

Citoquina	Anticuerpo de detección		
	Conc. final ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Buffer	Marca y #catálogo
IFN γ	1	PBS 10% SFB	BioLegend #505804
IL-4	*	PBS 10% SFB	BD # 51 -26512E
IL-5	*	PBS 10% SFB	BD # 51-26522E
IL-6	*	PBS 1% BSA	R&D # 840172
IL-10	*	PBS 10% SFB	BD # 51 -26572E
IL-10	*	PBS 1% BSA	R&D # 840126
IL-12p40	0.5	PBS 10% SFB	BL # 505302
IL-12p70	*	PBS 10% SFB	BD # 51-26612E
IL-13	*	PBS 1% BSA	R&D # 840250
IL-17	*	PBS 1% BSA	R&D # 840526
IL-1 β	*	PBS 10% SFB	BD # 51-26662E

Tabla 3.4.4. (c) Reactivos utilizados para medición de citoquinas por ELISA.

Se detallan los anticuerpos de captura y detección, y el estándar, utilizados en los diferentes ensayos de ELISA, así como sus diluciones de trabajo, *buffer* de dilución, marca y número de catálogo. *: se utilizó la dilución indicada por el fabricante en cada caso. UoE = *University of Edinburgh*.

3.4.5. Microscopía de epifluorescencia

Para obtener las microscopías de epifluorescencia de las BMDC incubadas con pLL o pLL^{NP} se sembraron 1×10^6 BMDC sobre vidrios estériles colocados en pocillos de placa de 24 pocillos de fondo plano y se incubaron con pLL (25 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ BMDC) o pLL^{NP} (75 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ BMDC), durante 18 horas. A tiempo cumplido, se retiraron los vidrios y se fijaron las células con 2% (m/v) PFA durante 20 minutos. Luego, los vidrios se incubaron 5 minutos con una solución de PBS conteniendo glicina 100 mM (para eliminar la fluorescencia proveniente del PFA) y se permeabilizaron las células con PBS conteniendo Tritón X-100 al 0.3% (v/v) otros 5 minutos. Los preparados se bloquearon con una solución de PBS conteniendo 1 % BSA (m/v), durante 1 hora, y se tiñeron las partículas de pLL^{NP} durante 30 minutos con la lectina PNA (del inglés, *peanut agglutinin*) conjugada a FITC y diluida en PBS 0.1% (m/v) BSA a la concentración final de 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ⁸. Como contratinción, se tiñeron el núcleo y el citoesqueleto de actina. Para teñir el núcleo celular se utilizó DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; sonda de unión a regiones ricas en timinas y

adeninas del ADN), y para teñir los filamentos de actina se utilizó faloidina (micotoxina de unión a los monómeros de actina polimerizados) conjugada al fluorocromo rodamina (0.3 µg/ml), durante 30 minutos. Después de cada incubación los preparados fueron lavados dos veces con PBS 0.1% (m/v) BSA. Por último, los vidrios se montaron en portaobjetos utilizando un medio de montaje conteniendo p-fenilendiamina (PPD, del inglés *p-phenylenediamine*) y Mowiol. Dicho medio fue preparado en el laboratorio siguiendo el protocolo descrito en *Harlow, E. & Lane, D. (1998)*⁹⁹ y *Vanes, K. & Brandt P. (1985)*¹⁰⁰. Los portaobjetos se guardaron a 4°C, en oscuridad hasta su observación. Las fotografías se obtuvieron con una cámara DS-Ri1 montada en un microscopio de epifluorescencia marca Nikon eclipse 80i.

3.4.6. Microscopía de campo claro

Las fotografías de los preparados celulares en contacto con pLL^{NP} vistos en microscopía de campo claro (cultivos celulares frescos, sin procesar) se obtuvieron en un microscopio invertido ZEISS Primovert acoplado a una cámara AxioCam Erc 5s.

3.5. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos de los datos se contó con el asesoramiento del Ing. Agr. Carlos González (M.Sc. en estadística).

Se aplicaron tests no paramétricos si los datos no cumplían las suposiciones de normalidad y/o de homogeneidad de varianzas, o tests paramétricos si: (i) se cumplían las suposiciones mencionadas o (ii) los datos no permitían aplicar tests no paramétricos, por ser los números de individuos/repeticiones demasiado pequeño o bien por ser estos números diferentes entre grupos/tratamientos y/o experimentos (datos no balanceados); en la posibilidad (ii) en general se tuvo que suponer normalidad y homogeneidad de varianzas, si bien frente a sesgos y/o diferencias evidentes de varianzas se transformaron los datos de forma de minimizar estos problemas. Tanto dentro de los análisis no paramétricos como paramétricos se aplicaron tests de una vía para hacer análisis intra-experimento, y tests de dos vías para integrar los

resultados de experimentos repetidos más de una vez. Se debe notar que los análisis de dos vías permiten determinar si un tratamiento experimental dado genera en una variable medida el mismo tipo de cambio (aumento, disminución) a través de experimentos independientes, aún cuando los valores absolutos de esa variable difieran, para cada tratamiento experimental, entre esos experimentos independientes.

Para análisis estadísticos de una vía se empleó el test no paramétrico de Mann-Whitney o el test paramétrico ANOVA con post test de Tukey (ambos mediante la utilización del software GraphPad Prism versión 5), según se informa en los correspondientes pies de figura. Los niveles de significancia según estos tests se indican en cada figura con asteriscos o la abreviatura “ns” (no significativo).

Para análisis estadísticos de dos vías se empleó el test no paramétrico de Friedman con post-test de Conover y corrección de Bonferroni, con o sin extensión según el número de réplicas por tratamiento y experimento¹⁰¹, o se recurrió a un análisis paramétrico por regresión lineal con variables ficticias, que es equivalente a un ANOVA de dos vías, pero es más apropiado para datos no balanceados¹⁰², como los nuestros. Ambos tipos de análisis se llevaron a cabo utilizando el *software* Microsoft Excel con el complemento *RealStatistics*. Los niveles de significancia según los tests de dos vías se indican en cada figura con símbolos de numeral (#) y la abreviatura “NS” (no significativo).

4. Resultados

4.1. Condicionamiento de células dendríticas por la larva de *Echinococcus granulosus s. l.*

4.1.1. Estudio de los mecanismos de condicionamiento de BMDC por pLL

Anteriormente, nuestro grupo de trabajo evaluó los efectos de una suspensión de partículas preparadas a partir de la capa laminar (pLL) sobre BMDC. En respuesta a pLL las BMDC manifiestan fenotipos no convencionales, que en ausencia de agonistas de TLR se caracterizan por la potenciación de la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 sin efectos sobre CD40 o la producción de citoquinas como IL-12 o IL-10. En presencia de agonistas de TLR (como el LPS), los efectos de pLL se expresan como inhibición de la expresión de CD40 y de la producción de IL-12p70 y potenciación de la producción de IL-10. En términos de CD86, pLL suma sus efectos a los efectos del agonista de TLR, potenciando la expresión de este marcador⁶⁷. También se observó que los efectos de pLL no están mediados por componentes solubles provenientes de las partículas⁶⁷.

Sobre las bases de lo anterior, en este trabajo nos preguntamos primeramente si los efectos de las partículas dependen exclusivamente de contacto o, si existen, además, “mediadores difusibles” producidos por aquellas células que contactan las partículas que son capaces de contribuir y/o inducir *per se* aspectos del fenotipo semi-maduro en células que no contactan las partículas. Esta última opción, de ser factible, permitiría obtener BMDC condicionadas sin necesidad de incubarlas con las partículas, facilitando así la realización de experimentos de co-cultivo que se mencionarán más adelante. Para investigar la existencia de mediadores difusibles en la inducción del fenotipo semi-maduro utilizamos un sistema de insertos *trans-well*. Este sistema divide cada pocillo de una placa de cultivo en un compartimento superior y uno inferior, separados por una membrana que permite el intercambio de moléculas solubles. En la práctica, se siembran células en ambos compartimentos, estando sólo las células colocadas en el compartimento inferior en contacto con pLL, mientras que el LPS, de estar presente, estimula a las células de ambos compartimentos (Figura 4.1.1.1. (a)). De lo anterior se

deduce que la producción de citoquinas por ambas poblaciones celulares debería cuantificarse intracelularmente, ya que el medio de cultivo es común a ambos compartimentos. Debido a que la técnica para dicha medición no está en uso en nuestro laboratorio, sólo se cuantificó la expresión de moléculas de superficie celular. Como se muestra en la Figura 4.1.1.1. (b), los experimentos mostraron que el contacto de las células con las partículas, a nivel de célula individual, es determinante para inducir el fenotipo semi-maduro en forma completa. Más en detalle, en términos de CD86 y en ausencia de LPS, las células del compartimento superior no respondieron a la presencia de pLL en el compartimento inferior. En presencia de LPS, las células del compartimento superior tampoco respondieron con la potenciación de la expresión de CD86 encontrada en el compartimento inferior, por el contrario, mostraron el efecto opuesto. Por su parte, se observó inhibición de la expresión de CD40 inducida por LPS en las células del compartimento superior. La menor expresión de CD86 y CD40 en las células del compartimento superior en presencia de pLL + LPS en comparación con LPS solamente sugiere la acción de factores difusibles con efectos anti-inflamatorios cuya liberación sería potenciada en las células en contacto con pLL.

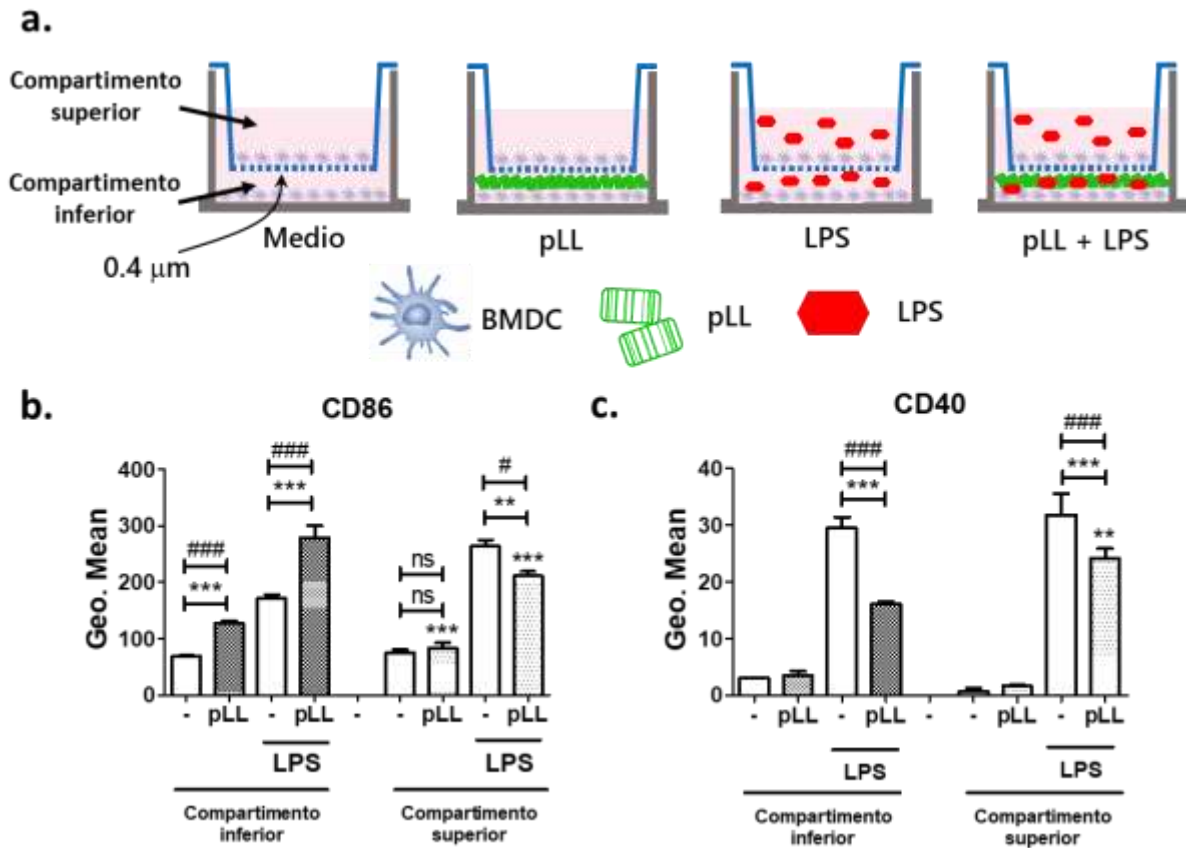


Figura 4.1.1.1. El contacto de las células con pLL, a nivel de célula individual, es indispensable para la inducción del fenotipo semi-maduro completo. Se utilizó el sistema de insertos *trans-wells* mostrado en (a) para evidenciar eventuales efectos de factores difusibles liberados por parte de las BMDC que contactan pLL sobre aquellas células que no lo hacen. Las BMDC fueron cultivadas en los compartimentos inferiores o superiores como se detalla en la sección 3.2.5. Se ensayaron las condiciones de pLL (25 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células), LPS (10 ng/ml) o pLL+/-LPS en las células de los compartimentos inferiores, mientras que las células cultivadas en los compartimentos superiores sólo fueron expuestas al medio o al LPS, según correspondiera. Se estimuló durante 18 hs y se midió la expresión de las moléculas CD86 (b) y CD40 (c) por citometría de flujo. Se muestran los datos de un experimento representativo de dos experimentos independientes. Los datos corresponden al promedio \pm los desvíos estándares de pocillos triplicados. Las significancias estadísticas señaladas sobre las barras correspondientes a los compartimentos superiores indican diferencias con las células de los compartimentos inferiores del mismo pocillo. Con asterisco se indican las diferencias estadísticas encontradas mediante el test estadístico paramétrico ANOVA de una vía con post-test Tukey, para el cual los datos fueron transformados usando logaritmo (CD86) o raíz cuadrada (CD40) para eliminar sesgo y/o hacer más homogéneas las dispersiones. Con numeral se indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos encontradas mediante el test estadístico de Friedman de dos vías integrando los 2 experimentos. ***/###, $P < 0.001$; **/##, $P < 0.01$; */#, $P < 0.05$.

Los resultados obtenidos utilizando los insertos *trans-well* daban lugar a una interrogante adicional ¿Cuál/es podrían ser el/los factores difusibles secretados en presencia de pLL + LPS que posean capacidades anti-inflamatorias? En este trabajo investigamos el rol del candidato soluble más inmediato: la citoquina anti-inflamatoria IL-10, cuyos niveles, como se explicó antes, aumentan significativamente luego de la estimulación de las BMDC con pLL+LPS⁶⁷. Para ello, realizamos experimentos de bloqueo de la actividad biológica de la IL-10 en los sobrenadantes de cultivo, empleando un anticuerpo específico. En estos experimentos, incluimos dos tipos de controles: estimulación en ausencia de anticuerpos y estimulación en presencia de un anticuerpo de igual isotipo y especie y a la misma concentración que el anticuerpo bloqueante (control isotópico). La comparación entre las condiciones sin agregado de anticuerpo y con anticuerpo control isotópico en el medio de cultivo nos permitió corroborar que la presencia de anticuerpos *per se* no altera el fenotipo semi-maduro, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos tratamientos en ninguna de las condiciones ensayadas.

Como se muestra en la Figura 4.1.1.2, no hubo efectos del bloqueo de la IL-10 sobre la expresión de CD86 en ausencia de LPS. Este resultado era esperable, ya que en ausencia de agonistas de TLR la producción de IL-10 es nula, o al menos no detectable en nuestras condiciones de ELISA. En presencia de LPS, no se esperaba que la IL-10 contribuyera al efecto de pLL sobre CD86, ya que el efecto de pLL es aumentar la expresión de dicha molécula mientras que el efecto esperado de la IL-10 era que inhibiera dicha expresión. En concordancia con esto, se observó un aumento en la expresión de CD86 en presencia del anticuerpo bloqueante de IL-10. Dicho aumento tuvo lugar tanto en presencia como en ausencia de pLL. Por lo tanto, los resultados indican que la IL-10 modula los efectos del LPS sobre BMDC en nuestro sistema experimental.

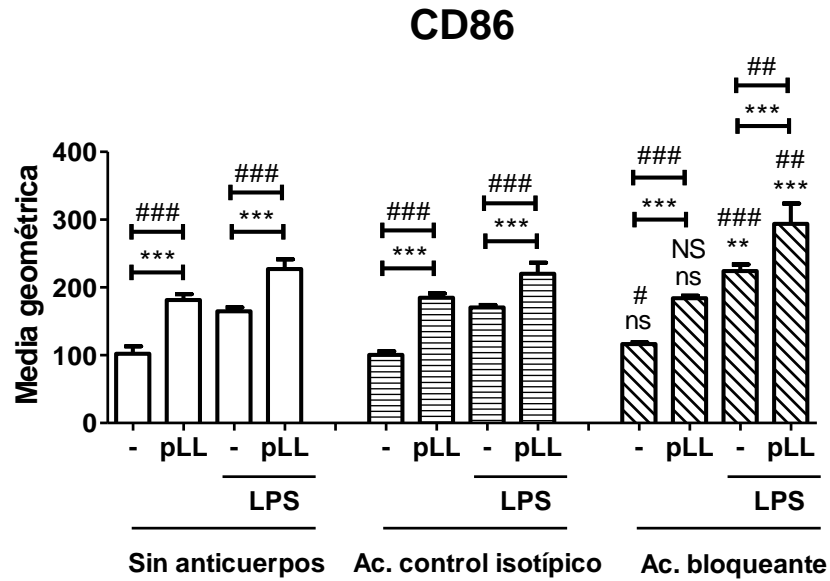


Figura 4.1.1.2. Efectos del bloqueo de la IL-10 sobre la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 en BMDC. Se estimularon las BMDC con pLL (25 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células), LPS (10 ng/ml), o pLL/LPS en ausencia de anticuerpos, en presencia de un anticuerpo control isotópico (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o de un anticuerpo bloqueante de la actividad biológica de la IL-10 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), durante 18 hs. Se midió el nivel de expresión de CD86 por citometría de flujo. Se muestran los datos de un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Los datos corresponden a los promedios \pm los desvíos estándares de pocillos triplicados. Las significancias estadísticas sobre los datos tratados con el anticuerpo bloqueante indican diferencias con los respectivos datos tratados con el anticuerpo control isotópico. Con asterisco y ns se indica la significancia estadística encontrada mediante el test paramétrico ANOVA de una vía con post-test Tukey, para el cual los datos fueron transformados usando logaritmo para eliminar sesgo y/o hacer más homogéneas las dispersiones. Con numeral y NS se indica la significancia estadística entre los tratamientos encontradas mediante el test no paramétrico de Friedman de dos vías integrando los 3 experimentos independientes. ***/###, $P < 0.001$; **/##, $P < 0.01$; */#, $P < 0.05$.

Con respecto a los efectos del bloqueo de IL-10 sobre CD40, se observó que dicha citoquina no influye significativamente sobre la expresión de este marcador (Figura 4.1.1.3).

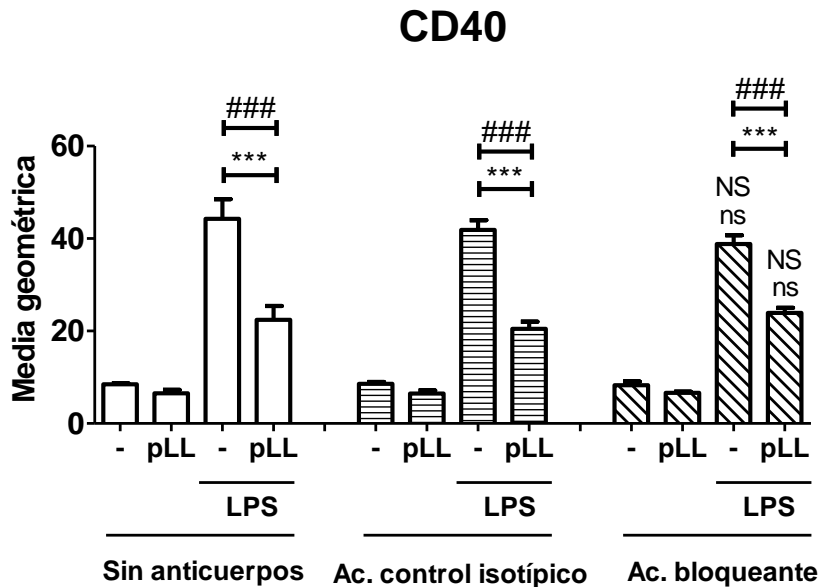


Figura 4.1.1.3. Efectos del bloqueo de la IL-10 sobre la expresión de la molécula co-estimuladora CD40 en BMDC. Se estimularon las BMDC con pLL (25 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células), LPS (10 ng/ml), o pLL/LPS en ausencia de anticuerpos, en presencia de un anticuerpo control isotópico (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o de un anticuerpo bloqueante de la actividad biológica de la IL-10 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), durante 18 hs. Se midió el nivel de expresión de CD40 por citometría de flujo. Se muestran los datos de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los datos corresponden a los promedios \pm los desvíos estándares de pocillos triplicados. Las significancias estadísticas sobre los datos tratados con el anticuerpo bloqueante indican diferencias con los respectivos datos tratados con el anticuerpo control isotópico. Con asterisco y ns se indica la significancia estadística encontrada mediante el test paramétrico ANOVA de una vía con post-test Tukey, para el cual los datos fueron transformados usando raíz cuadrada para eliminar sesgo y/o hacer más homogéneas las dispersiones. Con numeral y NS se indica la significancia estadística entre los tratamientos encontradas mediante el test no paramétrico de Friedman de dos vías integrando los 3 experimentos independientes. ***/###, $P < 0.001$; **/##, $P < 0.01$; */#, $P < 0.05$.

Luego, nos propusimos integrar las dos aproximaciones experimentales tratadas en esta sección, es decir agregar el anticuerpo bloqueante de IL-10 o su respectivo control isotópico a los cultivos de BMDC en el sistema de insertos *trans-well*. En la Figura 4.1.1.4. se muestra un resultado preliminar de este experimento, correspondiente a una única réplica. Como se muestra, este experimento corroboró las conclusiones obtenidas en los experimentos anteriores. En resumen, el bloqueo de la actividad biológica de la IL-10 en presencia de LPS potencia la expresión de CD86 tanto en ausencia como en presencia de pLL, pero no tiene efectos sobre la inhibición de la expresión de dicha molécula en las células del compartimento superior, por lo que dicha inhibición no se debe a la presencia de IL-10 en el medio de cultivo o, lo que es lo

mismo, existen otros factores difusibles responsables de la inhibición de CD86 observada en las células del compartimento superior. Por su parte, la inhibición en la expresión de CD40 observada en las células del compartimento superior en presencia de pLL no está mediada por la IL-10.

Resumiendo, existen factores difusibles diferentes a las IL-10 que contribuyen al efecto inhibitorio sobre CD40 a la vez que moderan el aumento de CD86 causado por el contacto con pLL.

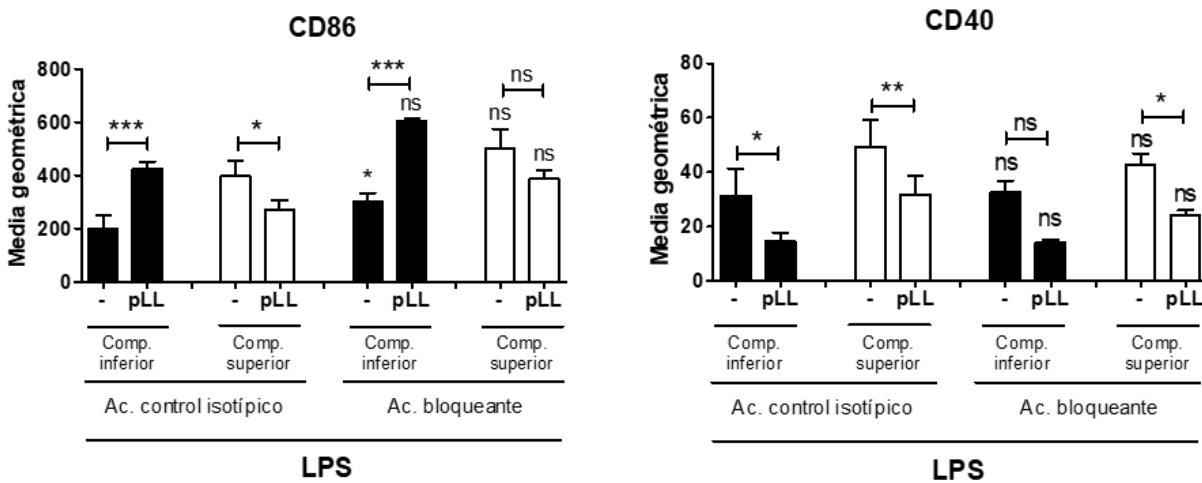


Figura 4.1.1.4. Efectos del bloqueo de la IL-10 sobre BMDC que contactan o no pLL. Se utilizó el sistema de insertos *trans-wells* descrito en la Figura 4.1.1.1. Las BMDC fueron cultivadas en los compartimentos inferiores o superiores. Se ensayaron las condiciones de pLL (25 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células), LPS (10 ng/ml) o pLL/LPS en las células de los compartimentos inferiores, mientras que las células cultivadas en los compartimentos superiores sólo fueron expuestas al LPS. Las BMDC se cultivaron en presencia de un anticuerpo control isotópico (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o de un anticuerpo bloqueante de la actividad biológica de la IL-10 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se estimuló durante 18 hs y se midió la expresión de las moléculas CD86 y CD40 por citometría de flujo. Los datos corresponden a los promedios \pm los desvíos estándares de pocillos triplicados. Se muestran los datos de un experimento. Se aplicó el test estadístico paramétrico ANOVA de una vía con post-test Tukey. Con asterisco se indican las diferencias estadísticas encontradas mediante el test estadístico paramétrico ANOVA de una vía con post-test Tukey, para el cual los datos fueron transformados usando logaritmo (CD86) o raíz cuadrada (CD40) a fin de eliminar sesgo y/o hacer más homogéneas las dispersiones. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

Con respecto a los efectos del bloqueo de la IL-10 sobre la producción de IL-12, se encontró que la IL-10 contribuye a moderar los niveles tanto de la subunidad IL-12/23p40 como de la IL-12p70 en respuesta a LPS, tanto en ausencia como en presencia de pLL (Figura 4.1.1.5), lo que concuerda con lo descrito previamente en la literatura¹⁰³.

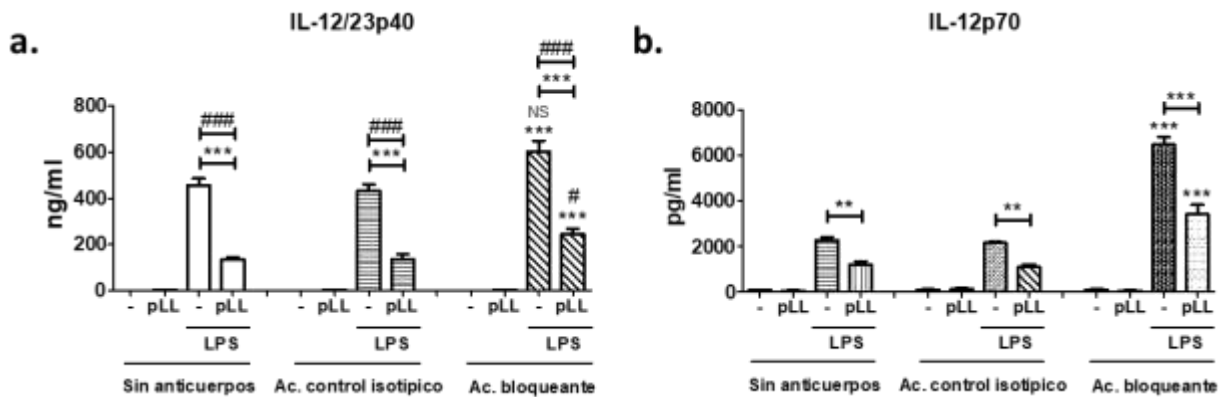


Figura 4.1.1.5. Efectos del bloqueo de la IL-10 sobre la producción de la IL-12 en BMDC. Se estimularon las BMDC con pLL (25 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células), LPS (10 ng/ml), o pLL/LPS en ausencia de anticuerpos, en presencia de un anticuerpo control isotípico (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o de un anticuerpo bloqueante de la actividad biológica de la IL-10 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), durante 18 hs. Se midió el nivel de producción de IL-12/23p40 (a) o IL-12p70 (b) por ELISA de los sobrenadantes de cultivo. En (a) se muestran los datos de un experimento representativo de dos experimentos independientes y en (b) se muestran los datos de un único experimento. Los datos corresponden a los promedios \pm los desvíos estándares de pocillos triplicados. Las significancias estadísticas sobre los datos tratados con el anticuerpo bloqueante indican diferencias con los respectivos datos tratados con el anticuerpo control isotípico. Con asterisco y ns se indica la significancia estadística encontrada mediante el test paramétrico ANOVA de una vía con post-test Tukey. Con numeral y NS se indica la significancia estadística entre los tratamientos encontradas mediante el test no paramétrico de Friedman de dos vías integrando 2 experimentos independientes. ***/####, $P < 0.001$; **/###, $P < 0.01$; */#, $P < 0.05$.

En resumen, los resultados indican que los efectos de pLL sobre las BMDC dependen fuertemente del contacto célula-partícula pero que existen factores difusibles que una vez inducidos por dicho contacto, en presencia de LPS, actúan de forma independiente del mismo, contribuyendo a algunas características del fenotipo (CD40) y moderando otras (CD86). También muestran que estos factores difusibles son diferentes a la IL-10, si bien la IL-10 modera la expresión de IL-12 y CD86 en respuesta al LPS en nuestro sistema experimental.

4.1.2. Evaluación de los efectos de pLL^{NP} sobre BMDC

Como ya se vio, la inducción del fenotipo semi-maduro por pLL demostró ser dependiente del contacto de cada célula con las partículas. Además, resultados previos del grupo demostraron que moléculas o estructuras fuertemente vinculadas a los mecanismos de fagocitosis, como lo son el citoesqueleto de actina, Syk o PI3K de clase I, son necesarias para la inducción del fenotipo^{67,104}. Resultaba interesante, entonces, investigar si la internalización de partículas era necesaria para la inducción del fenotipo semi-maduro por partículas de la LL.

El estudio de la internalización de pLL por BMDC fue abordado previamente por el grupo, sin lograr observar ningún evento de fagocitosis¹⁰⁴. El trabajo con pLL dificulta este estudio debido a las características físicas del material y la distribución de tamaño de las partículas, altamente heterogénea. Dicha preparación posee una gran proporción en masa de partículas no fagocitables, de tamaño mayor al corte de la malla por la que es filtrada la suspensión (23 μm), presumiblemente debido a la flexibilidad y forma aplanada de las partículas. Asimismo, la preparación posee partículas de menor tamaño, algunas de las cuales son incluso más pequeñas que el tamaño celular y, por lo tanto, factibles de ser fagocitadas. Las características físicas de la LL hacen difícil obtener un filtrado compuesto solamente por partículas de tamaño homogéneo, fagocitable, que facilite los ensayos. Además, era de nuestro interés obtener materiales parasitarios más representativos de aquellos a los que se enfrentan las células durante la infección. Con ello en mente, trabajamos en la puesta a punto de varios protocolos de diferenciación *in vitro* de microhidátides a partir de psc, sin resultados favorables (ver Anexo 8.2). Como otra aproximación, en este trabajo exploramos los efectos de una variante de pLL, llamada pLL^{NP} (del inglés *non phagocytatable particulate Laminated Layer*), en la que, a pesar de que el tamaño de las partículas continúa siendo heterogéneo, todas las partículas son de tamaño no fagocitable (Fig. 4.1.2.1). La preparación de pLL^{NP} implica una serie de pasos que se explicitan en la sección 3.1.2.

Se compararon los efectos de pLL^{NP} y pLL sobre BMDC en términos de la producción de las citoquinas IL-10 e IL-12p70 (Figura 4.1.2.2). Ambas preparaciones mostraron efectos similares sobre el fenotipo de las células, aunque pLL^{NP} fue menos potente a igual masa seca. Esto último

podría deberse a que la superficie neta de partículas presente en las dosis de 25 μg de masa seca de pLL es significativamente mayor a la presente en 25 μg de masa seca de pLL^{NP}. En base a estos resultados, se eligió la dosis de pLL^{NP} correspondiente a 75 μg de masa seca/ 1×10^6 BMDC. Vale aclarar que, previamente, verificamos que dicha dosis no afectaba la viabilidad celular mediante la utilización de la sonda ToPro-3 (datos no mostrados). Las BMDC estimuladas con pLL^{NP} presentaron el fenotipo semi-maduro antes descrito en términos de CD86 y CD40 además de IL-10 e IL-12, aunque con diferencias cuantitativas con respecto a pLL (resultados no mostrados) (Figura 4.1.2.3.). El conjunto de los efectos de pLL^{NP}, como se había observado antes para pLL (Pittini Á, 2016), fue dependiente del citoesqueleto de actina y de la señalización a través de PI3K de clase I. Aunque la inducción de la expresión de CD86 y la inhibición de CD40 parecieron no depender de Syk, dicho inhibidor parece eliminar la inducción del fenotipo semi-maduro en términos de IL-10 e IL-12p70 (Figura 4.1.2.4.). Estos resultados indican que la inducción del fenotipo semi-maduro por partículas de LL es independiente de la fagocitosis de las partículas, si bien depende de componentes de la maquinaria fagocítica.

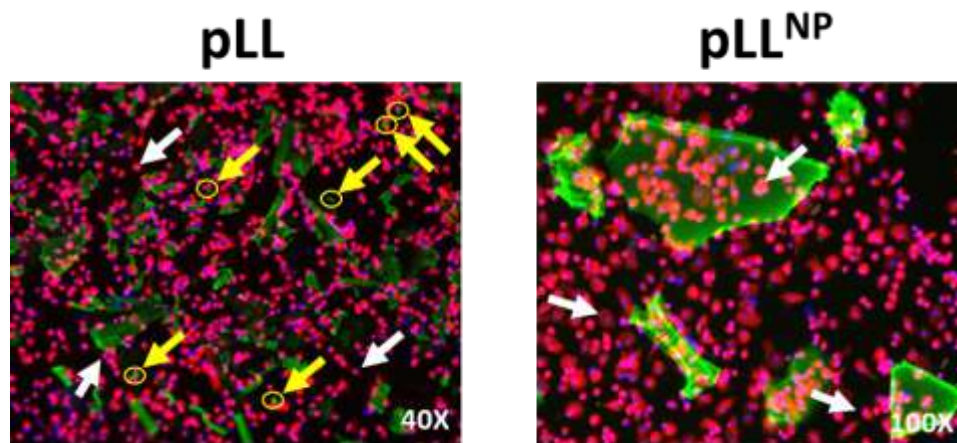


Figura 4.1.2.1. Comparación del tamaño de las partículas de pLL y pLL^{NP} entre sí, y con el tamaño de las BMDC. Se muestran microscopías de epifluorescencia de las BMDC incubadas con pLL y pLL^{NP}. Con flechas blancas se señalan algunas células, y con flechas amarillas y círculos amarillos se señalan partículas de pLL de tamaño fagocitable. DAPI (azul): núcleos celulares, Rodamina-faloidina (rojo): citoesqueleto de actina, PNA-FITC (verde): pLL o pLL^{NP}.

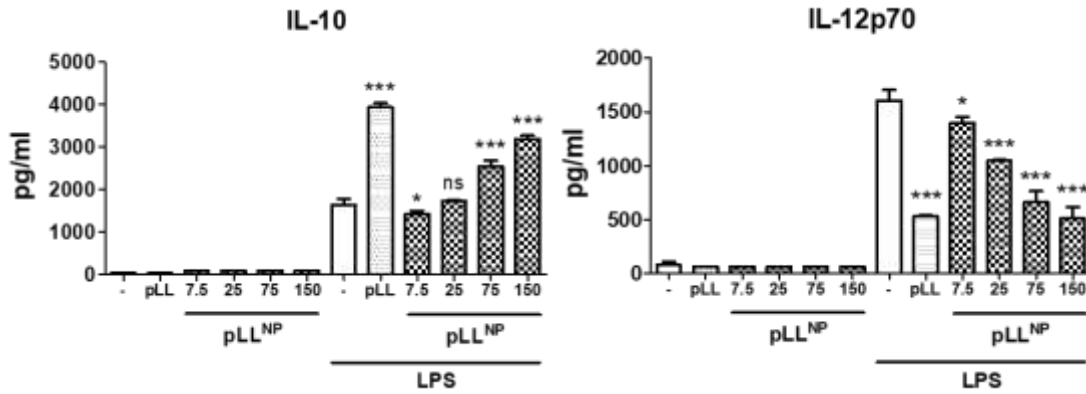


Figura 4.1.2.2. Evaluación de los efectos de diferentes dosis de pLL^{NP} sobre BMDC. Las BMDC se estimularon con pLL (25 µg/1x10⁶ células), pLL^{NP} (7.5, 25, 75 o 150 µg/1x10⁶ células), LPS (10 ng/ml), pLL/LPS o las diferentes dosis de pLL^{NP}/LPS, durante 18 hs. Se midieron los niveles de IL-10 e IL-12p70 por ELISA de los sobrenadantes de cultivo. Los datos corresponden a un único experimento. Los datos corresponden al promedio +/- los desvíos estándares de pocillos triplicados. Se aplicó el test estadístico ANOVA de una vía con post-test Tukey. Las diferencias estadísticas que se muestran sobre las barras corresponden a la comparación de los tratamientos con la condición de LPS solamente. ***, P < 0.001; **, P < 0.01; *, P < 0.05.

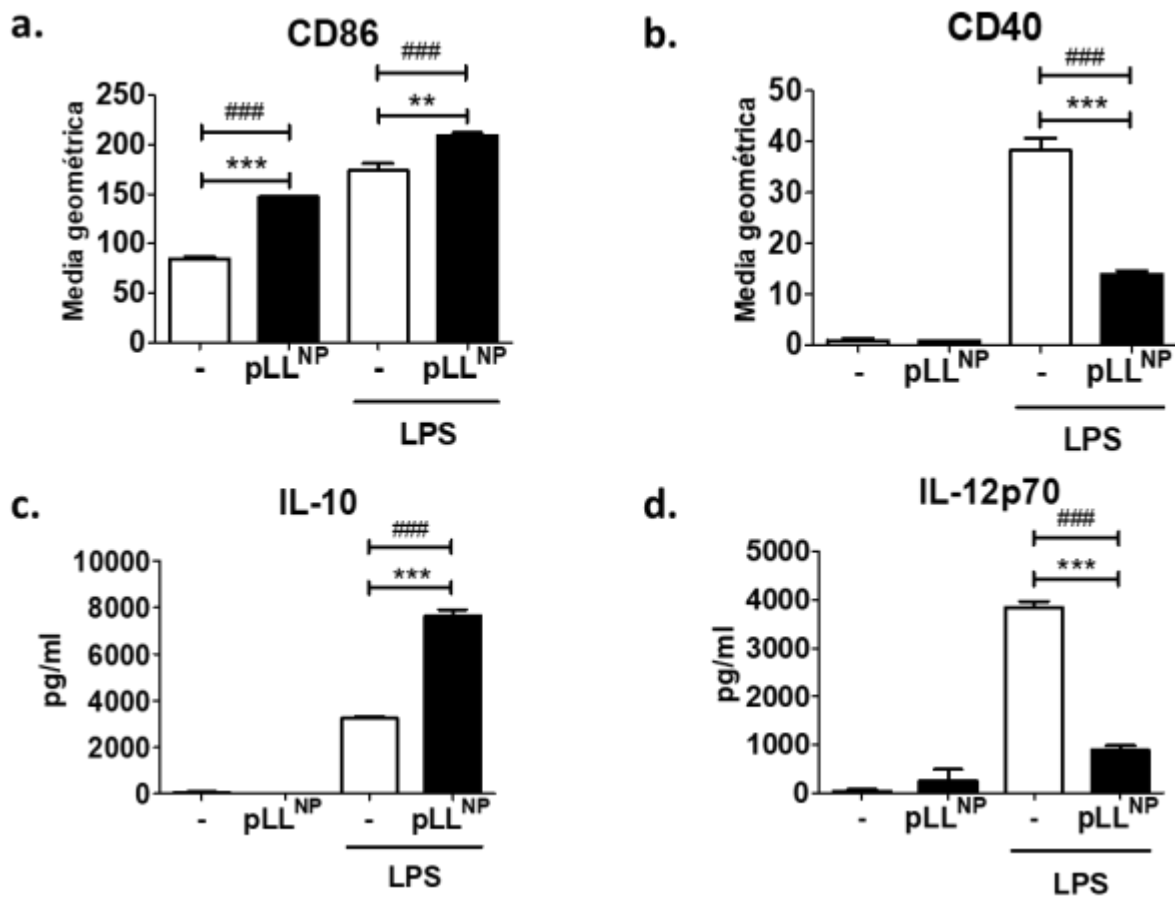


Figura 4.1.2.3. pLL^{NP} induce el fenotipo semi-maduro en BMDC. Las BMDC se estimularon con pLL^{NP} (75 μ g/ 1×10^6 células), LPS (10 ng/ml), o pLL^{NP}/LPS, durante 18 hs. Se midieron los niveles de expresión de las moléculas de superficie CD86 (a) y CD40 (b) por citometría de flujo, y los niveles de producción de IL-10 (c) e IL-12p70 (d) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Se muestran los datos de un experimento representativo de 12. Los datos corresponden al promedio \pm los desvíos estándares de pocillos triplicados. Con asterisco se indican las diferencias estadísticas encontradas mediante el test ANOVA de una vía con post-test Tukey. Con numeral se indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos encontradas mediante el test no paramétrico de Friedman de dos vías, integrando 12 experimentos (a), 9 experimentos (b), 12 experimentos (c), u 11 experimentos (d). ***/###, $P < 0.001$; **/##, $P < 0.01$; */#, $P < 0.05$.

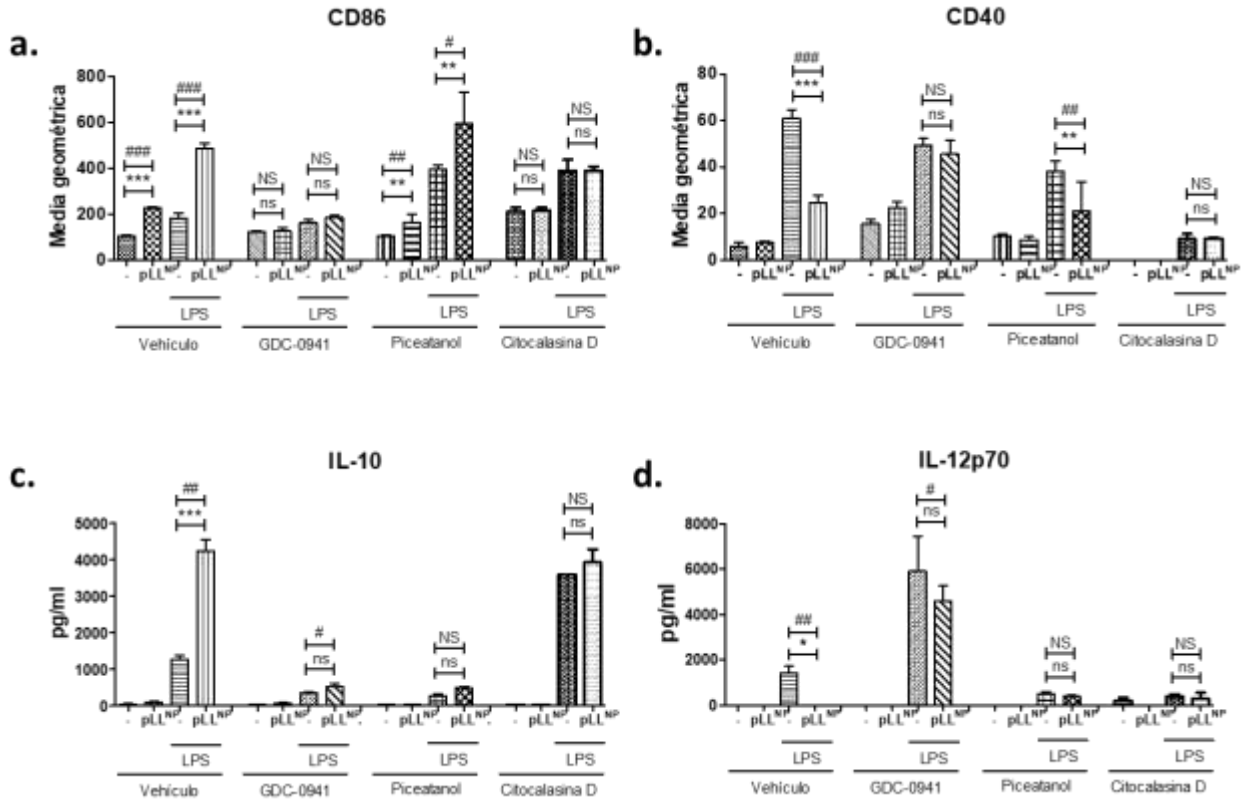


Figura 4.1.2.4. Los efectos de pLL^{NP} sobre las BMDC dependen del citoesqueleto de actina y de la señalización a través de PI3K de clase I. Las BMDC se pre-incubaron en ausencia/presencia del inhibidor de PI3K de clase I, GDC-0941, del inhibidor de Syk, piceatanol, o del inhibidor de la dinámica de actina, citocalasina D, o DMSO como vehículo. Luego se estimularon con pLL^{NP} (25 µg/1x10⁶ células), LPS (10 ng/ml), o pLL^{NP}/LPS, durante 18 horas. Se midió la expresión de las moléculas CD40 (a) y CD86 (b) y los niveles de producción de IL-10 (c) e IL-12p70 (d) por ELISA de los sobrenadantes de cultivo. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. Los datos corresponden a los promedios +/- los desvíos estándares de pocillos triplicados. Con asterisco y ns se indica la significancia estadística encontrada mediante el test paramétrico ANOVA de una vía con post-test Tukey, para el cual los datos de expresión de CD86 y CD40 fueron transformados usando logaritmo y raíz cuadrada, respectivamente, para eliminar sesgo y/o hacer más homogéneas las dispersiones. Con numeral y NS se indica la significancia estadística entre los tratamientos encontradas mediante el test no paramétrico de Friedman de dos vías integrando 2 experimentos independientes. ***/###, P < 0.001; **/##, P < 0.01; */#, P < 0.05.

4.1.3. Optimización de estrategias para la separación de BMDC de las partículas de pLL^{NP}

La obtención de BMDC condicionadas por material de la LL y luego separadas de las partículas fue un punto esencial de este trabajo, ya que el estudio de la funcionalidad de las BMDC implicaba su co-cultivo con LT, los que podrían verse afectados por la presencia de material parasitario. La preparación de pLL, debido al pequeño tamaño de algunas de sus partículas, dificultó su separación de las células sin que se alterase el fenotipo de estas últimas (*Casaravilla C., resultados previos no publicados*). Además, resultados de la sección 4.1.1 mostraron que no era posible obtener el fenotipo semi-maduro exponiendo a las BMDC solamente a sobrenadantes de cultivo de otras BMDC en contacto con pLL. En contraste con estas dificultades, la preparación de pLL^{NP} nos abría la posibilidad de condicionar las células con partículas y luego separarlas en base a diferencia de tamaño. A su vez, la posibilidad de eliminar el contacto entre las células y las partículas daba lugar a una nueva pregunta con respecto a la naturaleza del condicionamiento celular: ¿es necesario el contacto continuo con las partículas para que las células mantengan el fenotipo semi-maduro? o, en otras palabras ¿es posible incubar a las células con las partículas durante un período breve y seguir observando los efectos luego de su separación?

Inicialmente, ensayamos un protocolo de separación por decantación diferencial en el tiempo de las células y las partículas, que al ser más grandes decantan más rápidamente. Dicho método no fue totalmente eficiente, en la medida que implicaba pérdida de células y la existencia de un remanente de partículas pequeñas que, aunque de mayor tamaño que las células, decantaban en un tiempo similar a estas, probablemente debido a sus características físicas peculiares (una dimensión mucho mayor que las otras dos). Entonces, optimizamos un protocolo de filtración de la suspensión a través de una malla de tamaño de poro que permitiera el pasaje de las BMDC y retuviera a las partículas. Para evitar la activación de las BMDC por estrés mecánico escogimos una malla del mayor tamaño de poro posible que no permitiera pasar partículas. Como se mencionó anteriormente, pLL^{NP} constituye la porción retenida luego de filtrar una suspensión de partículas a través de una malla de 23 μm de corte, por lo que no esperábamos tener partículas menores a dicho tamaño. Por lo anterior, y teniendo en cuenta que el tamaño de las BMDC es de 10-15 μm , se decidió filtrar las suspensiones por mallas de 23 μm . En la Figura 4.1.3.1 se muestran

fotografías de las células incubadas con los diferentes estímulos, y de los mismos pocillos luego de filtrar las suspensiones celulares por 23 μm , como se detalla en la sección 3.2.1. La figura muestra claramente cómo el método de separación por filtración elimina las partículas de la suspensión celular.

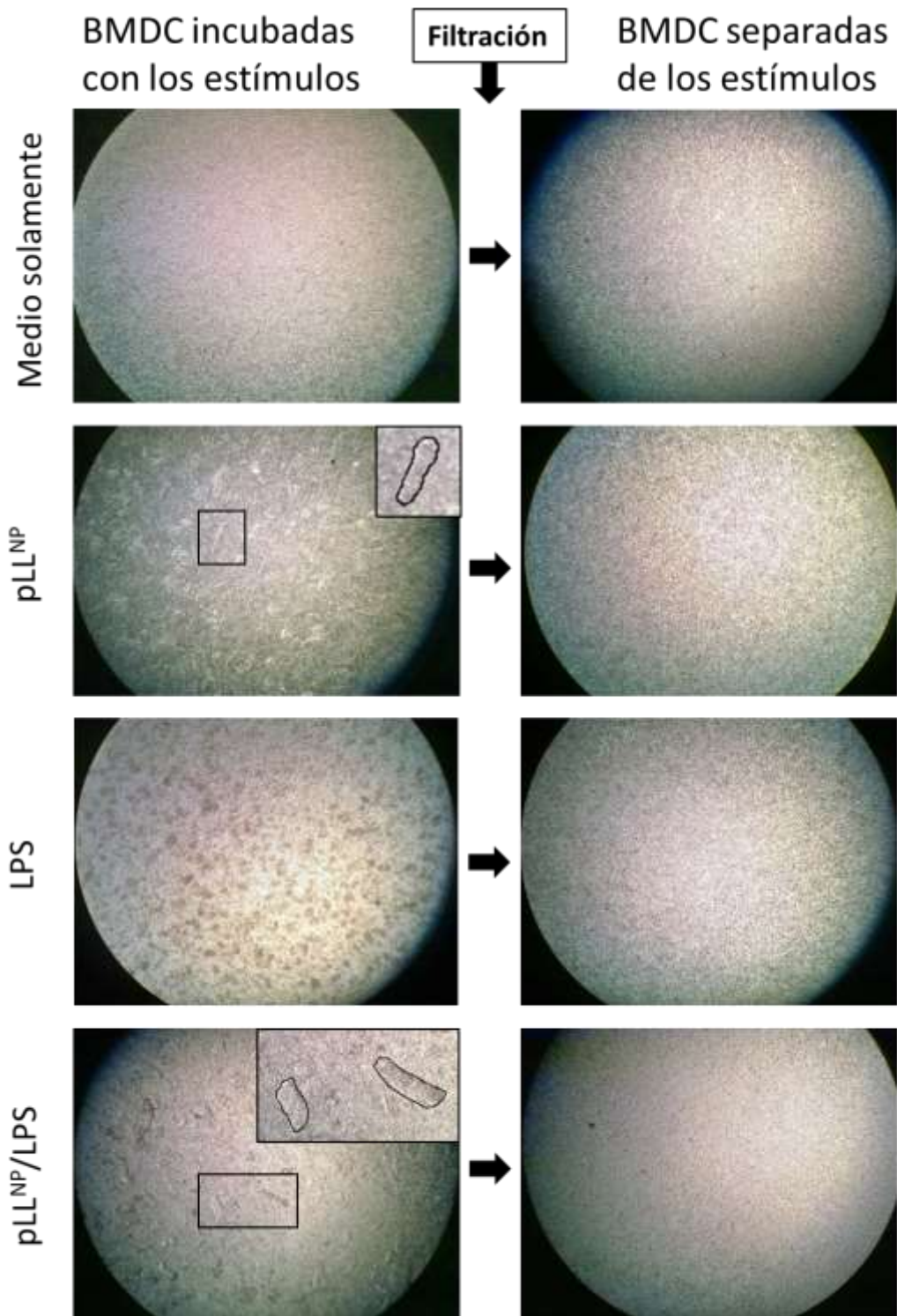


Figura 4.1.3.1. Separación de las BMDC de las partículas de pLL^{NP}. Fotografía de microscopías de campo claro de las células incubadas 3 horas con pLL^{NP}, LPS o pLL^{NP}/LPS, antes y después de ser separadas de los estímulos por filtración. En las condiciones de incubación con pLL^{NP} y pLL^{NP}/LPS antes de la filtración se amplía un cuadro del campo y se resaltan algunas partículas de pLL^{NP}. Todas las fotografías fueron tomadas con el aumento 40X.

Sin embargo, se debía descartar que el proceso de filtración afectara el fenotipo semi-maduro adquirido por las células debido al contacto con las partículas. En este sentido, en la Figura 4.1.3.2 se muestra cómo la expresión de las moléculas co-estimuladoras, CD86 y CD40, inducidas por pLL^{NP} sobre las células no se vio afectada inmediatamente después de la filtración, tomando como referencia el método de decantación diferencial en el tiempo que, como se explicó, si bien no elimina todas las partículas se considera que es improbable que afecte el fenotipo de las BMDC.

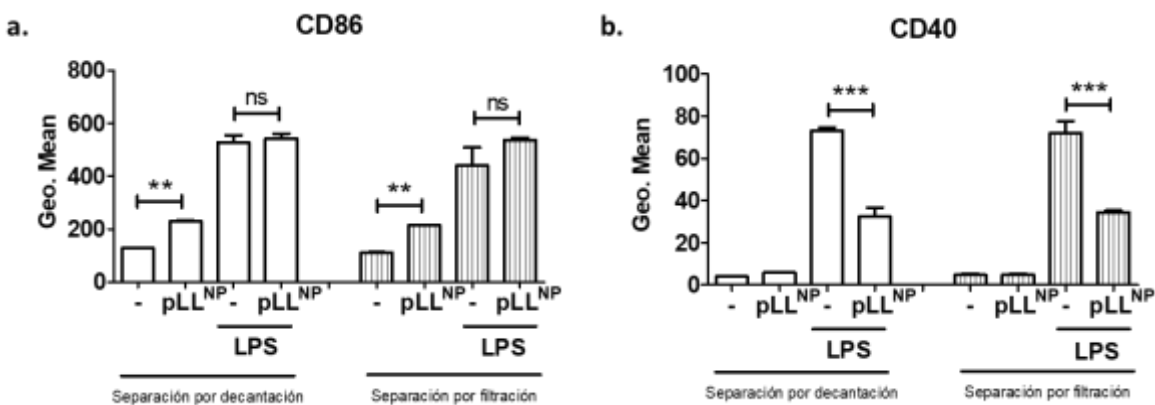


Figura 4.1.3.2. La filtración de las BMDC no altera el fenotipo inducido por pLL^{NP} en ausencia o presencia de LPS. Las BMDC se estimularon con pLL^{NP} (75 µg/1x10⁶ células), LPS (10 ng/ml), o pLL^{NP}/LPS, durante 18 hs. Luego se separaron de las partículas por decantación diferencial en el tiempo o por filtración a través de una malla de 23 µm de corte y se midieron los niveles de expresión de las moléculas de superficie CD86 (a) y CD40 (b) por citometría de flujo. Los datos corresponden a los promedios +/- los desvíos estándares de pocillos triplicados y fueron transformados usando logaritmo (CD86) y raíz cuadrada (CD40), previo al análisis estadístico, para eliminar sesgo y/o hacer más homogéneas las dispersiones. Se aplicó el test estadístico ANOVA de una vía con post-test Tukey. ***, P < 0.001; **, P < 0.01; *, P < 0.05.

En este sistema ensayamos también si era posible inducir el fenotipo semi-maduro en BMDC mediante una incubación más corta con pLL^{NP}. El interés por estimular a las BMDC durante un período breve surgió a partir de resultados que sugirieron que luego de 18 horas de incubación las BMDC podrían estar “exhaustas” a los efectos de condicionar a los LT, en forma similar a lo observado en *Langenkamp A. y cols. (2000)*¹⁰⁵.

Nuestros resultados mostraron que luego de 3 horas de estimulación de las células con pLL^{NP}, no se indujeron cambios en la expresión de las moléculas CD86 y CD40 a nivel de superficie celular, probablemente porque la cinética de expresión de dichas moléculas es mayor al tiempo

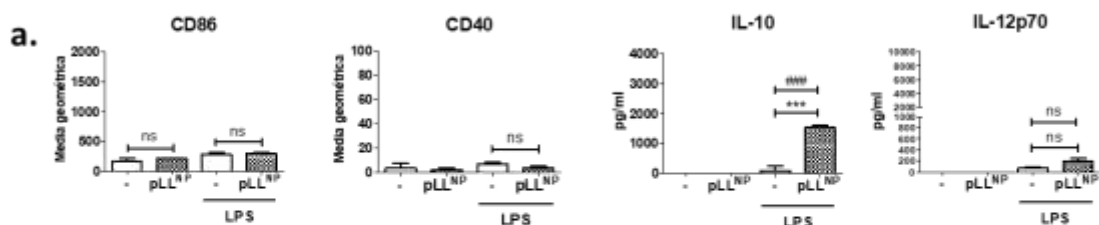
ensayado; en ese sentido, resultados previos del grupo muestran que la expresión de CD86 en superficie celular, en respuesta al estímulo con pLL, comienza a detectarse a partir de las 4 horas post-estimulación. Tampoco fue posible detectar a la citoquina IL-12p70 en los sobrenadantes de cultivo a este tiempo de estimulación. En cambio, luego de 3 horas de estimulación con pLL^{NP}+LPS la secreción de IL-10 por parte de las células alcanzó niveles altos, incluso similares a los encontrados luego de 18 horas de acumulación de la citoquina en presencia de los estímulos (Figuras 4.1.3.3. (a) y (c)). La rápida cinética en la producción de esta citoquina y sus mayores niveles en presencia de pLL^{NP}+LPS en comparación con LPS solamente se reprodujeron a lo largo de 9 experimentos.

Por su parte, luego de 3 horas de estimulación de las células y posterior cultivo 18 horas adicionales en ausencia de estímulos, se observa que la inducción por LPS de las citoquinas y moléculas de superficie se sostiene (en términos de CD86, CD40 e IL-10), alcanzando valores similares a los encontrados luego de 18 horas de estímulo continuo. Sin embargo, la secreción de IL-12p70 es significativamente menor cuando se remueve el LPS, en comparación con la estimulación continua con este agonista (Figura 4.1.3.3. (b) y (c)). Con respecto a la estimulación con partículas y LPS, se observó que el efecto de pLL^{NP} sobre la inhibición de la expresión de CD40 continúa manifestándose independientemente de la presencia continua de los estímulos. En el caso de CD86, los efectos de pLL^{NP}, tanto en ausencia como en presencia de LPS, no fueron totalmente reproducibles, lo que redundó en ausencia de significancia estadística cuando se aplicó el test de Friedman de dos vías integrando los 9 experimentos realizados. Para la potenciación de la secreción de IL-10 inducida por pLL^{NP} se observó, como para la inhibición de CD40, que se mantenía el efecto pese a la separación de las partículas. En el caso de la IL-12p70, los bajos niveles de secreción en células sometidas a filtración hacen difícil la comparación de los efectos de las partículas en ausencia y presencia continua de los estímulos. Sin embargo, continúa observándose un nivel significativamente menor de la secreción de IL-12p70 en células inicialmente incubadas en presencia de pLL^{NP} y luego mantenidas 18 hs en ausencia de los estímulos.

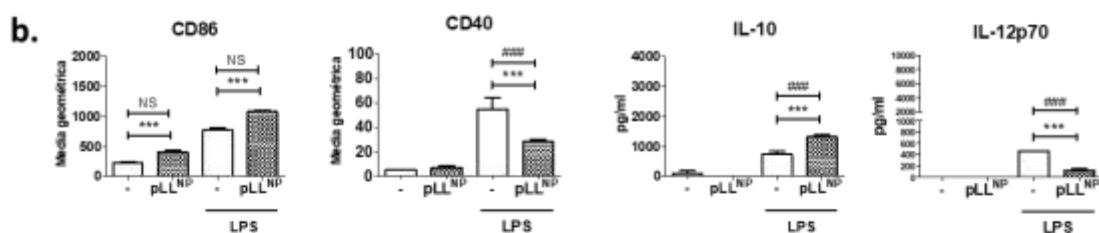
Resumiendo, la estimulación de las células durante 3 horas es suficiente para que, luego de 18 horas adicionales en ausencia de estímulos, se continúe expresando el fenotipo semi-

maduro en términos de CD40, IL-10 e IL-12p70. Esto último, evidencia que al menos para dichas moléculas, los mecanismos de señalización intracelular involucrados, una vez activados mediante la estimulación con pLL^{NP} en presencia de LPS, son capaces de conducir a los efectos fenotípicos independientemente de la presencia continua de las partículas.

3 horas de estimulación



3 horas de estimulación + 18 horas en ausencia de estímulos



18 horas de estimulación

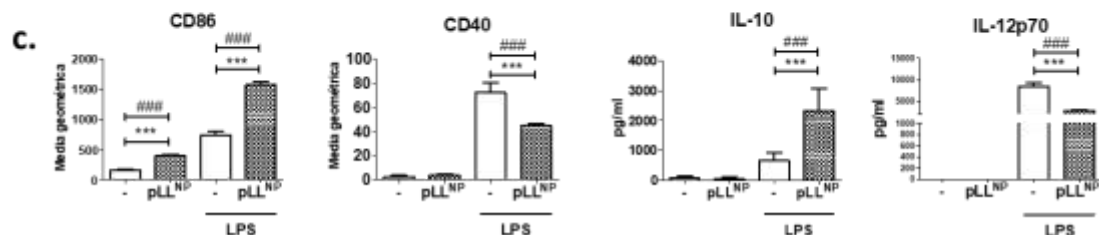


Figura 4.1.3.3. Los efectos de pLL^{NP} se pueden observar luego de sólo 3 horas en presencia de las partículas seguidas de 18 horas adicionales en ausencia de las mismas. En (a) se muestra el fenotipo de las BMDC estimuladas con pLL^{NP} (75 µg/1x10⁶ células), LPS (10 ng/ml), o pLL^{NP}+LPS, durante 3 hs. En (b) se muestra el fenotipo de BMDC estimuladas durante 3 hs, separadas de los estímulos por filtración a través de una malla de 23 µm de corte e incubadas otras 18 hs en ausencia de estímulos. En (c) se muestran las BMDC incubadas igual que en (a) pero durante 18 hs. Se midieron los niveles de expresión de las moléculas de superficie CD40 y CD86 por citometría de flujo, y los niveles de producción de IL-10 e IL-12p70 en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los datos son representativos de 9 experimentos independientes. Los datos corresponden a los promedios +/- los desvíos estándares de pocillos triplicados en el caso de (a) y (c), y de pocillos duplicados en el caso de (b). Los datos fueron transformados usando logaritmo (CD86) y raíz cuadrada (CD40), previo al análisis estadístico, para eliminar sesgo y/o hacer más homogéneas las dispersiones. Con asterisco se indican las diferencias estadísticas encontradas mediante el test ANOVA de una vía con post-test Tukey. Con numeral se indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos encontradas mediante el test de Friedman de dos vías integrando 9 experimentos. ***/####, P 0.001; **/###, P < 0.01; */#, P < 0.05.

4.1.4. Evaluación de la funcionalidad de BMDC condicionadas con pLL^{NP}

Nuestro grupo ha trabajado intensamente en la elucidación de los mecanismos implicados en la inducción del fenotipo semi-maduro en BMDC. En esta Tesis nos planteamos evaluar la funcionalidad de las BMDC condicionadas con partículas de la LL en cuanto a su capacidad de inducir una respuesta inmune adaptativa. Para abordar este objetivo se realizaron ensayos de MLR (del inglés, *mixed lymphocyte reaction*). Dichos ensayos se basan en la presentación de péptidos propios por parte de DC pertenecientes a una cepa de ratón particular a LT CD4⁺ provenientes de una cepa de ratón diferente¹⁰⁶. Concretamente, BMDC diferenciadas a partir de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron condicionadas con medio, pLL^{NP}, LPS, o pLL^{NP}+LPS, separadas de los estímulos y co-cultivadas con LT CD4⁺ purificados de bazos de ratones Balb/c. Luego de 5 días se evaluó el perfil de citoquinas presentes en los sobrenadantes del co-cultivo (IFN- γ , IL-17, IL-5, IL-13 e IL-10).

Los primeros ensayos fueron realizados utilizando BMDC condicionadas durante 18 horas con los estímulos y posteriormente co-cultivadas con los LT CD4⁺. Sin embargo, en estas condiciones no se observaron efectos reproducibles de las BMDC condicionadas por pLL sobre el perfil de citoquinas producido por los LT efectores co-cultivados. Este resultado nos indujo a plantear que inclusive en las primeras horas del co-cultivo (claves para el condicionamiento de los LT), las BMDC podrían haber perdido el condicionamiento inducido por pLL 18 horas antes. Fue por esto que en los ensayos posteriores se utilizaron BMDC estimuladas durante 3 horas, de modo que al ser co-cultivadas con los LT, el condicionamiento por pLL fuera reciente y el fenotipo mantenido al menos por varias horas más.

Al finalizar los cultivos se observó una mayor secreción de IL-5 e IL-17 por parte de aquellos LT CD4⁺ estimulados por BMDC condicionadas con únicamente pLL^{NP} que por LT estimulados por BMDC previamente incubadas en medio solamente. Además, se observó un aumento significativo en la producción de IL-17 en respuesta a la utilización de BMDC condicionadas con pLL^{NP} y LPS en comparación con células condicionadas con LPS solamente (Figura 4.1.4.1). En cambio, en términos de IL-13, IL-10 e IFN- γ , los ensayos mostraron poca reproducibilidad (resultados no mostrados).

También nos propusimos evaluar los efectos del condicionamiento de las BMDC por pLL^{NP} sobre su capacidad de afectar la inducción de LT_{reg} FoxP3⁺, en presencia de IL-2 y TGF- β agregados a los co-cultivos¹⁰⁷. Si bien el funcionamiento del sistema no fue reproducible, en aquellos experimentos en los que se observó inducción de LT_{reg} FoxP3⁺, la presencia de pLL^{NP} no alteró los porcentajes de LT_{reg} FoxP3⁺ inducidos (resultados no mostrados).

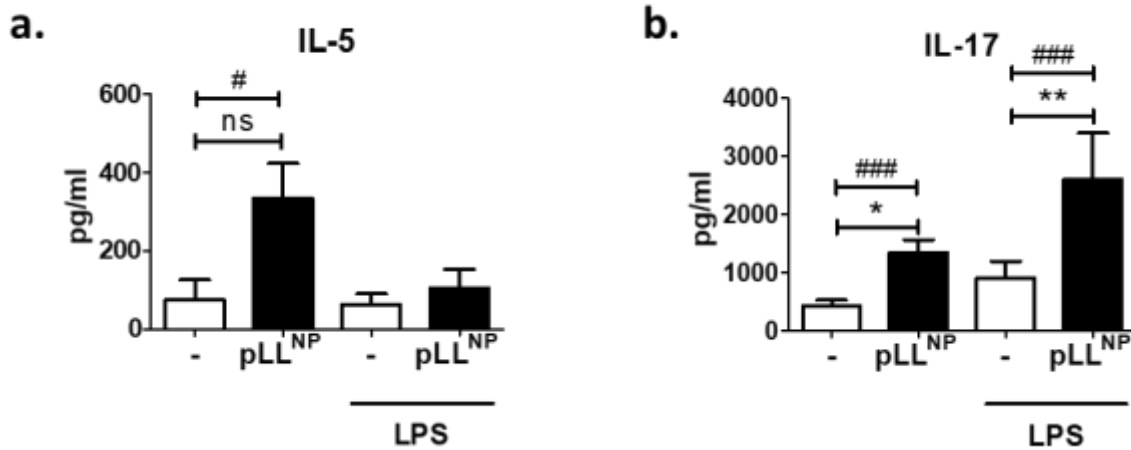


Figura 4.1.4.1. Evaluación de la funcionalidad de BMDC condicionadas con pLL^{NP} en ensayos MLR: estudio de la producción de citoquinas. Se diferenciaron BMDC a partir de ratones C57BL/6 y se estimularon con pLL^{NP}, LPS, o ambos estímulos juntos durante 3 horas. Las células se separaron de los estímulos por filtración/centrifugación y se co-cultivaron con LT CD4⁺ purificados de ratones BALB/c, durante 5 días. Se midieron los niveles de producción de citoquinas por ELISA de los sobrenadantes de cultivo. En (a) se muestra la producción de IL-5 y en (b) se muestra la producción de IL-17. Los datos corresponden a los promedios +/- los desvíos estándares de pocillos triplicados. Con asterisco se indican las diferencias estadísticas encontradas mediante el test paramétrico ANOVA de una vía con post-test Tukey, para el cual los datos de IL-5 fueron transformados usando raíz cuadrada para eliminar sesgo y/o hacer más homogéneas las dispersiones. Con numeral se indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos encontradas mediante el test no paramétrico de Friedman de dos vías, integrando los 8 experimentos realizados. ***/###, P < 0.001; **/##, P < 0.01; */#, P < 0.05.

4.2. Ensayos empleando el modelo de infección secundaria con *E. granulosus s. l.*

Hasta ahora, nos hemos centrado en el estudio del efecto de materiales de la LL de *E. granulosus s. l.* sobre BMDC. Pero ¿cómo reacciona el sistema inmune del hospedero a la infección por el parásito *per se*? ¿cuáles son las principales poblaciones celulares reclutadas durante la infección crónica con el parásito? Más aún, ¿qué fenotipo adquieren las DC presentes

en el sitio de infección o, qué polarización T se desencadena en respuesta a dicha infección? Durante la infección crónica, ¿se observa un fenotipo semi-maduro en las DC locales equivalente al observado al condicionar BMDC con partículas de la LL? En esta sección de la Tesis abordaremos estas preguntas utilizando un modelo de infección secundaria crónica de ratones con *E. granulosus s. l.* Brevemente, y como se mencionó en la sección 3.3.1., a un grupo de ratones hembra C57BL/6 se les inyectó, vía intraperitoneal, 2000 psc viables (ratones infectados), mientras que al otro grupo de ratones se les inyectó 200µl de PBS apirógeno (ratones control). Los ratones fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Higiene durante 6 meses, tiempo al que fueron sometidos a eutanasia. Las células de la CP obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo y se midieron diversas citoquinas en el líquido recuperado del primer lavado peritoneal por ELISA. Además, se extrajeron los ganglios mesentéricos y los bazos de todos los ratones para analizar efectos de la infección a nivel de la inmunidad adaptativa: estudio de las células por citometría de flujo y/o ensayos de re-estimulación *ex vivo* para evaluar la respuesta celular en términos de producción de citoquinas

4.2.1. Análisis global de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de ratones infectados por *E. granulosus s. l.*

Los resultados presentados en esta sección fueron obtenidos por la Dra. Cecilia Casaravilla (no publicados) y se muestran con el fin de dar contexto a los análisis sobre DC y respuesta T que les siguen. En la Figura 4.2.1.1 (a) se observa que el número de células totales en la CP de ratones infectados es significativamente mayor que en ratones control. Pero, concretamente ¿qué poblaciones celulares ven aumentada su presencia en la CP? En la parte (b), de la Figura 4.4.2.1 se muestra el porcentaje y número total de macrófagos residentes en la CP (definidos como F4/80^{alto}). Como se observa, si bien no hay cambios en el porcentaje de estas células al comparar los grupos control e infectados, el número total de las mismas aumenta significativamente en los ratones infectados. El mismo análisis aplica al estudio de los monocitos (definidos como Ly6C⁺) (Figura 4.4.2.1 (c)) y linfocitos B (CD19⁺, resultados no mostrados). En el caso de la población de

eosinófilos (definidos como células Siglec-F⁺), tanto el número como el porcentaje aumentan significativamente en la CP de ratones infectados (Figura 4.4.2.1. (d)).

En resumen, en nuestro modelo de infección secundaria crónica de ratones por *E. granulosus s. l.* se observa que existe un aumento significativo del número de células total de la CP y en particular de macrófagos, linfocitos B y eosinófilos. El estudio de las DC, por ser la población celular objetivo de este trabajo, se abordará en la siguiente sección.

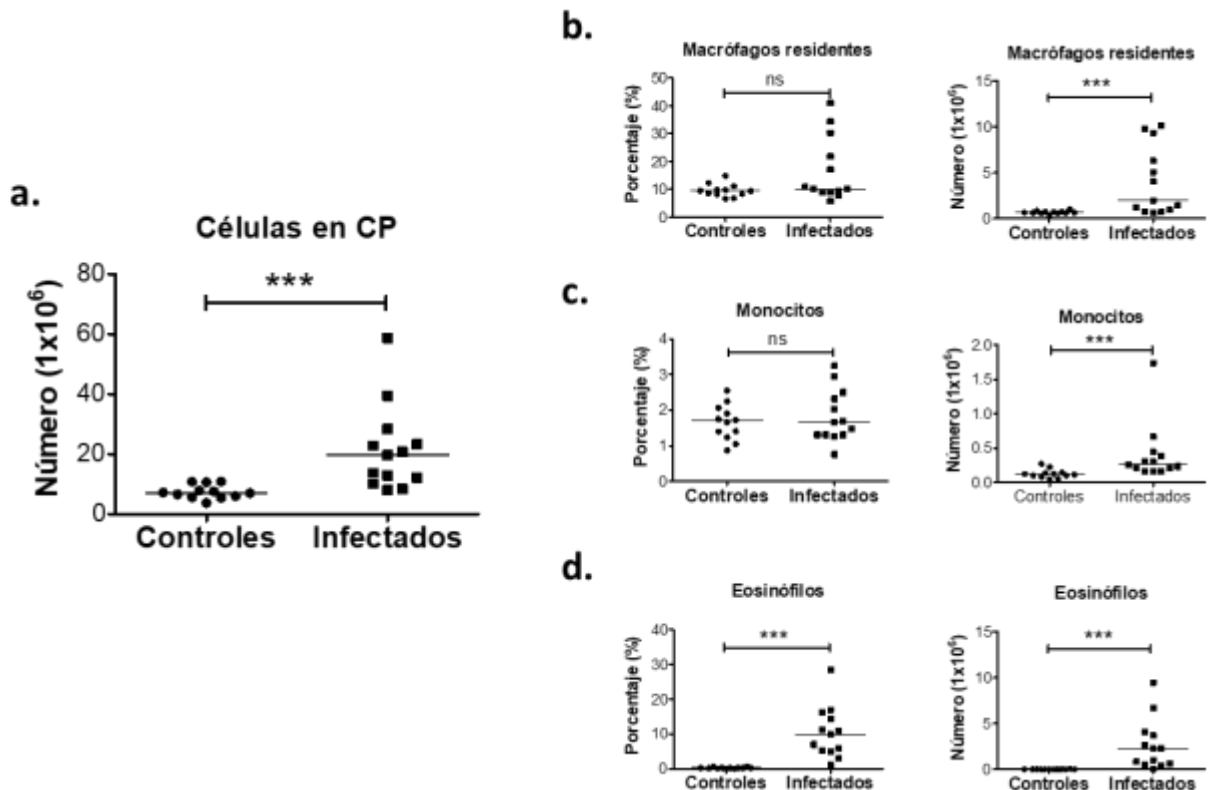


Figura 4.2.1.1. Análisis global de la celularidad de la CP de ratones con infección secundaria de 6 meses por *E. granulosus s. l.* Se muestra el número de células total presente en la CP de ratones controles e infectados (a) así como el número total (paneles de la izquierda) y porcentaje (paneles de la derecha) de macrófagos residentes (F4/80^{alt}) (b), monocitos (Ly6C⁺) (c), y eosinófilos (Siglec-F⁺) (d). Se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney. ***, P < 0.001; **, P < 0.01; *, P < 0.05. Resultados no publicados de C. Casaravilla.

4.2.2. Estudio del fenotipo adquirido por células dendríticas en el modelo de infección secundaria con *E. granulosus s. I.*

En la figura 4.2.2.1 se muestra la estrategia de *gating* utilizada para identificar DC peritoneales (definidas como CD11c⁺ MHCII⁺). Cabe mencionar que, en el último *gate* de la estrategia se cuidó que no existieran macrófagos contaminantes, ya que, como se vio en la sección anterior, el número de macrófagos aumenta significativamente en el sitio de infección. Debido a la falta de detectores de fluorescencia para incorporar al panel de anticuerpos utilizado un anticuerpo que reconociera F4/80 (marcador de macrófagos de ratón), se decidió diseñar *gates* estrictos para identificar a las DC, aunque ello significara excluir algunas células de interés del análisis. En la Figura 4.2.2.2 se muestra la definición de DC en todos los ratones de un experimento representativo de tres.

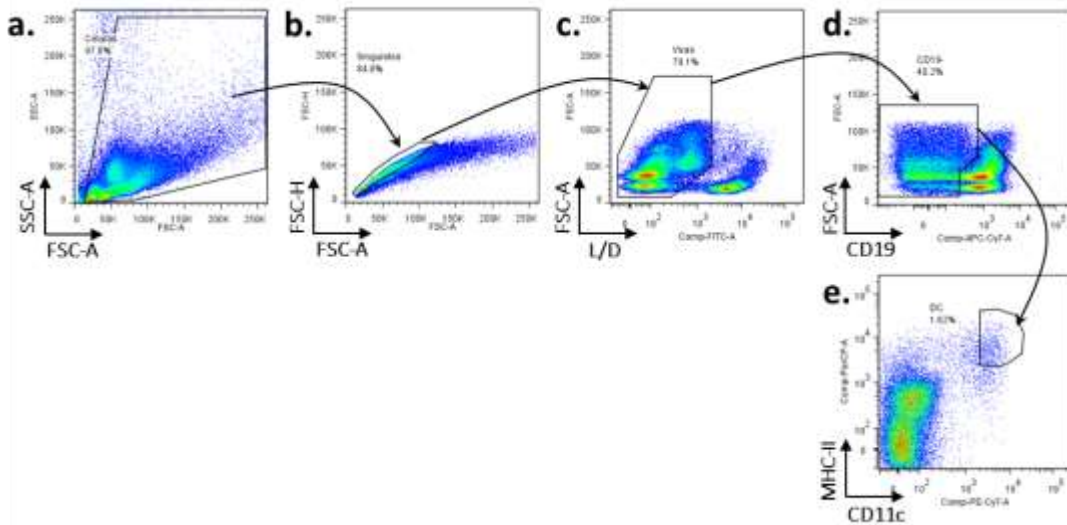


Figura 4.2.2.1. Estrategia de *gating* utilizada para definir DC de CP en los ensayos de infección secundaria por *E. granulosus s. I.* Se muestra la estrategia de marcado y clasificación que se utilizó para definir las DC de cavidad peritoneal. En (a) se excluyen los restos celulares, en (b) se excluyen los dobletes, en (c) se excluyen las células muertas, en (d) se excluyen los linfocitos B y en (e) se definen las DC. En las tinciones en las que se marcó CD40, CD86 y PD-L2 no se incluyó el paso (c), por no contar con suficientes detectores de fluorescencia.

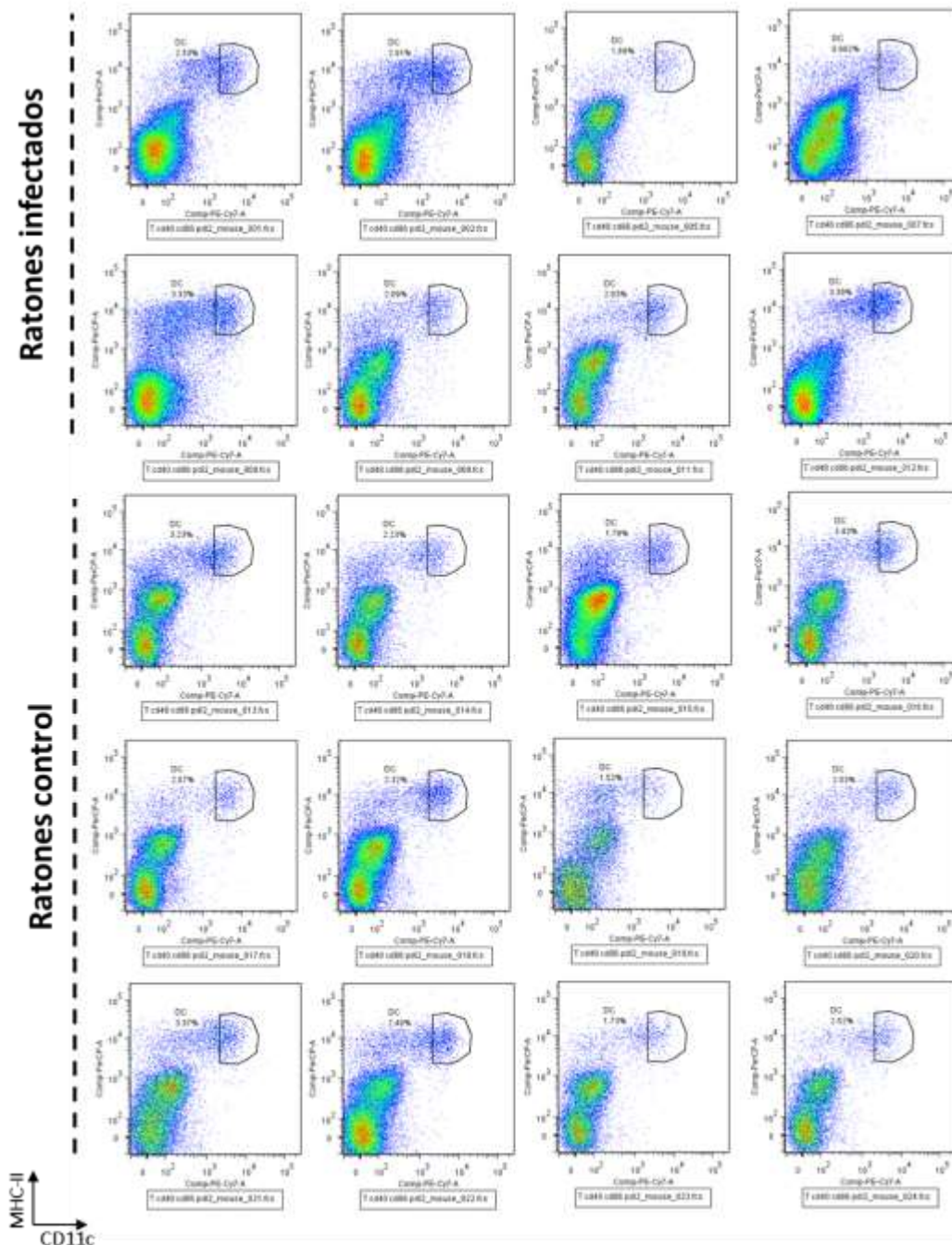


Figura 4.2.2.2. Definición de DC de CP en los experimentos de infección secundaria por *E. granulosus* I. Los ratones infectados se inyectaron con 2000 psc, vía ip., mientras que los controles se inyectaron con PBS. Ambos grupos se sometieron a eutanasia 6 meses más tarde, durante la fase crónica de la infección y las células peritoneales se recuperaron mediante lavados peritoneales. Los gráficos son representativos de 3 experimentos independientes. Nota: Los números de ratones infectados no son consecutivos porque se excluyeron aquellos que no presentaron hidátides al momento de la eutanasia.

En la Figura 4.2.2.3. se muestran los gráficos correspondientes al porcentaje y número total de DC en la CP de ratones controles e infectados. Se observa que, si bien no hay cambios en los porcentajes, el número de DC presentes en la CP es mayor en los ratones infectados que en los controles. Vale la pena mencionar que la distribución bimodal observada en el porcentaje y número total de DC en los ratones infectados no guarda una relación obvia con la cantidad de hidátides encontradas en las CP (datos no mostrados).

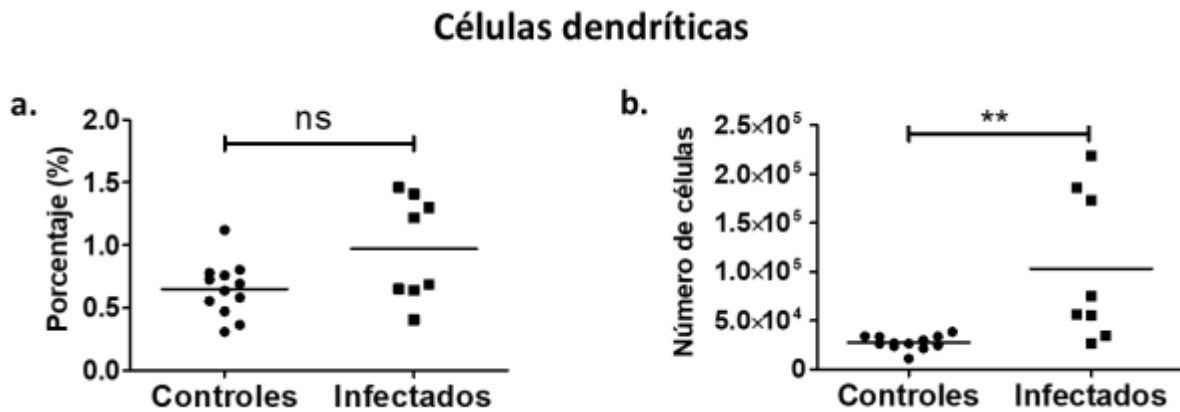


Figura 4.2.2.3. Análisis del número y porcentaje de DC de CP en los experimentos de infección secundaria por *E. granulosus s. l.* Se muestran los porcentajes y números de DC, definidas como CD11c⁺ MHCII⁺, en los grupos control e infectado (a y b, respectivamente). Se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

Para estudiar el fenotipo adquirido por las DC en el contexto de la infección secundaria crónica por *E. granulosus s. l.* se midió la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD86, CD80 y CD40, y de moléculas co-inhibitorias como PD-L1 y PD-L2.

Con respecto al fenotipo de las DC de CP, en las Figuras 4.2.2.4. a 4.2.2.8 se muestran los resultados obtenidos a partir de un experimento representativo de tres realizados, excepto para la molécula PD-L2, cuya expresión sólo fue determinada en un único experimento. Los controles de fluorescencia (FMO, del inglés *Fluorescence minus one*, sección 3.4.1) nos permitieron utilizar los gráficos *dot plot* para determinar el porcentaje de células positivas para los diferentes marcadores. Además de estudiar el porcentaje de células que expresan el marcador, nos

interesamos en analizar el nivel de expresión de la molécula en la población que la expresa (media geométrica de la población positiva para la molécula).

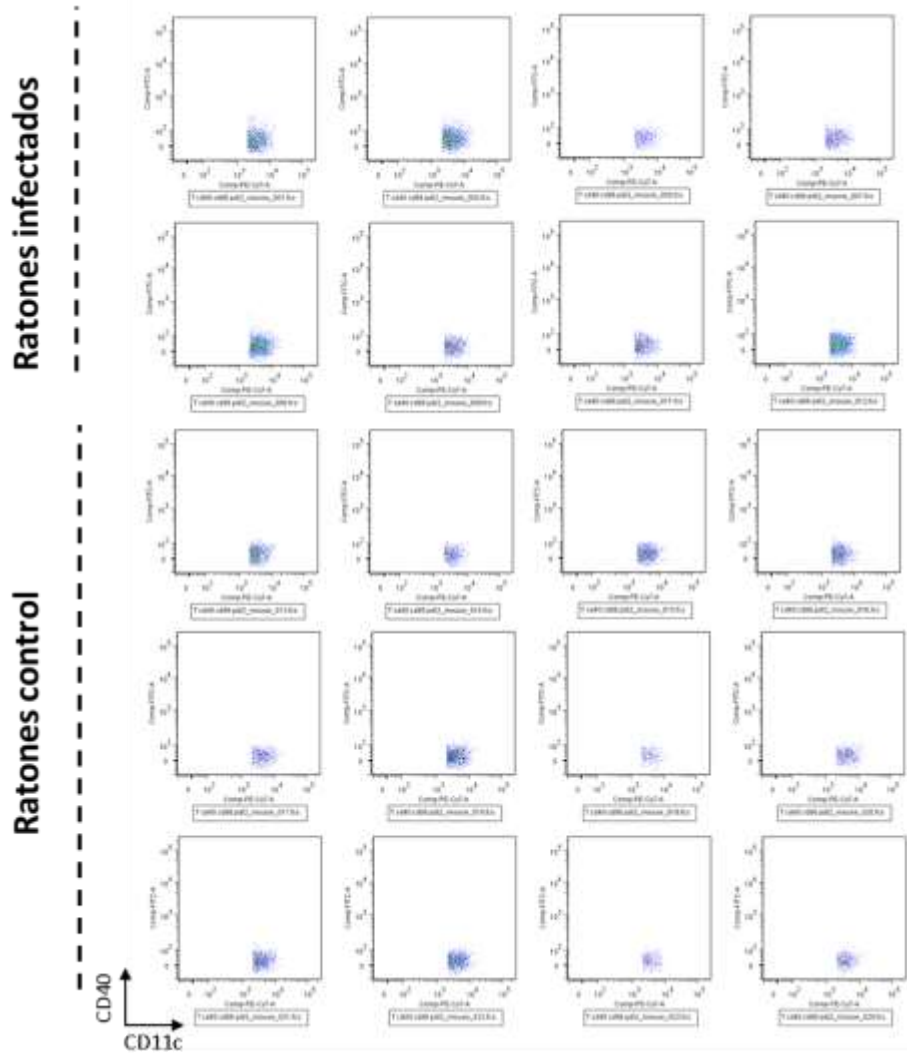
Como se muestra en la Figura 4.2.2.4 (a) para CD40 no se pudo determinar el porcentaje de células positivas debido a un error técnico con los controles FMO. Por lo tanto, en este caso sólo se analizó el nivel de expresión de CD40 en la población total de DC (media geométrica de la población total). Los resultados indicaron que las DC de CP de ratones infectados expresan mayores niveles de CD40 que las DC provenientes de CP de ratones control. También se analizó la expresión de CD86 en las DC (Figura 4.2.2.5). En este caso se vio mayor porcentaje de células positivas y nivel de expresión de CD86 cuando se analizaron los tres experimentos independientes juntos mediante la estadística de dos vías. En el caso de CD80 no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los parámetros evaluados (Figura 4.2.2.6). En cambio, el estudio de las moléculas co-inhibitorias (PD-L1 y PD-L2) mostró que tanto el porcentaje de DC que expresan dichas moléculas, así como el nivel en lo que lo hacen, es mayor en DC provenientes de CP de ratones infectados (Figuras 4.2.2.7 y 4.2.2.8).

Por otra parte, estudiamos el fenotipo de las DC provenientes de los ganglios mesentéricos, drenantes de la CP (Ver Anexo 8.1). El estudiar el fenotipo de las DC presentes en el sitio de inducción de las respuestas adaptativas era particularmente interesante para establecer vínculos entre dicho fenotipo y la respuesta adaptativa que se desencadena frente al parásito. Este experimento se realizó una única vez. Las figuras que muestran la estrategia de *gating* y los *dot plots* forman parte del material suplementario. Como se muestra en la Figura 4.4.2.9, el porcentaje y número total de DC provenientes de ganglios mesentéricos de ratones control e infectados no mostraron diferencias significativas. Lo mismo sucedió con el porcentaje de células positivas y el nivel de expresión de CD40 y CD86. En el caso de CD80 se observó menor nivel de expresión de dicha molécula en los ratones infectados, sin cambios en el porcentaje de células positivas para CD80. Por su parte, en el análisis de la molécula co-inhibitoria PD-L1 se observó un nivel significativamente menor tanto de su expresión como del porcentaje de células positivas en ratones infectados y, para PD-L2 se observaron tendencias similares a las encontradas para PD-L1 pero que no fueron estadísticamente significativas. Así, los patrones de

expresión de PD-L1 y PD-L2 en las DC de ganglio mesentérico mostraron tendencias contrarias a las encontradas en las DC de CP (Figura 4.2.2.9).

Resumiendo, cuando se comparan las DC provenientes de CP de ratones controles e infectados se observa que aquellas provenientes de CP de ratones infectados muestran mayor expresión de la molécula co-estimuladora CD40 y CD86 (en este caso cuando se analizan los tres experimentos juntos), sin acompañamiento en los niveles de expresión CD80, a la vez que se observa una expresión aumentada y mayor porcentaje de células que expresan las moléculas co-inhedoras PD-L1 y PD-L2. Por su parte, las DC de ganglio mesentérico no presentan alteraciones en la expresión de ninguna de las moléculas co-estimuladoras estudiadas, excepto por un menor nivel de expresión de CD80, y, con respecto a las moléculas co-inhedoras, se observa menor nivel de expresión de PD-L1 y del porcentaje de células positivas para dicho marcador y una tendencia a la disminución en ambos parámetros en el caso de PD-L2.

a.



b.

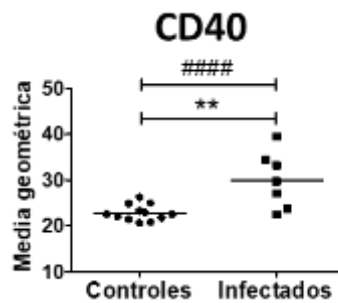


Figura 4.2.2.4. Expresión de la molécula co-estimuladora CD40 en DC de CP en infección secundaria por *E. granulosus s. l.* Se muestra la expresión de CD40 en DC de CP en forma de *dot plots* (a) y de gráfico de nivel de expresión de CD40 (media geométrica) (b). En (a) no se definieron cuadrantes por errores técnicos con los controles FMO. En (b) se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney (asteriscos) y el análisis paramétrico por regresión lineal con variables ficticias integrando los 3 experimentos previa transformación de los datos usando raíz cuadrada ($P < 4 \times 10^{-7}$ numerales). Se muestra un experimento representativo de tres. ####, $P < 0.0001$; **/###, $P < 0.001$; **/##, $P < 0.01$; */#, $P < 0.05$.

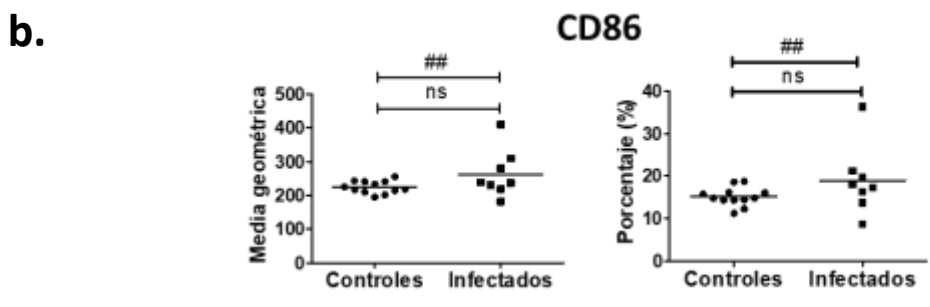
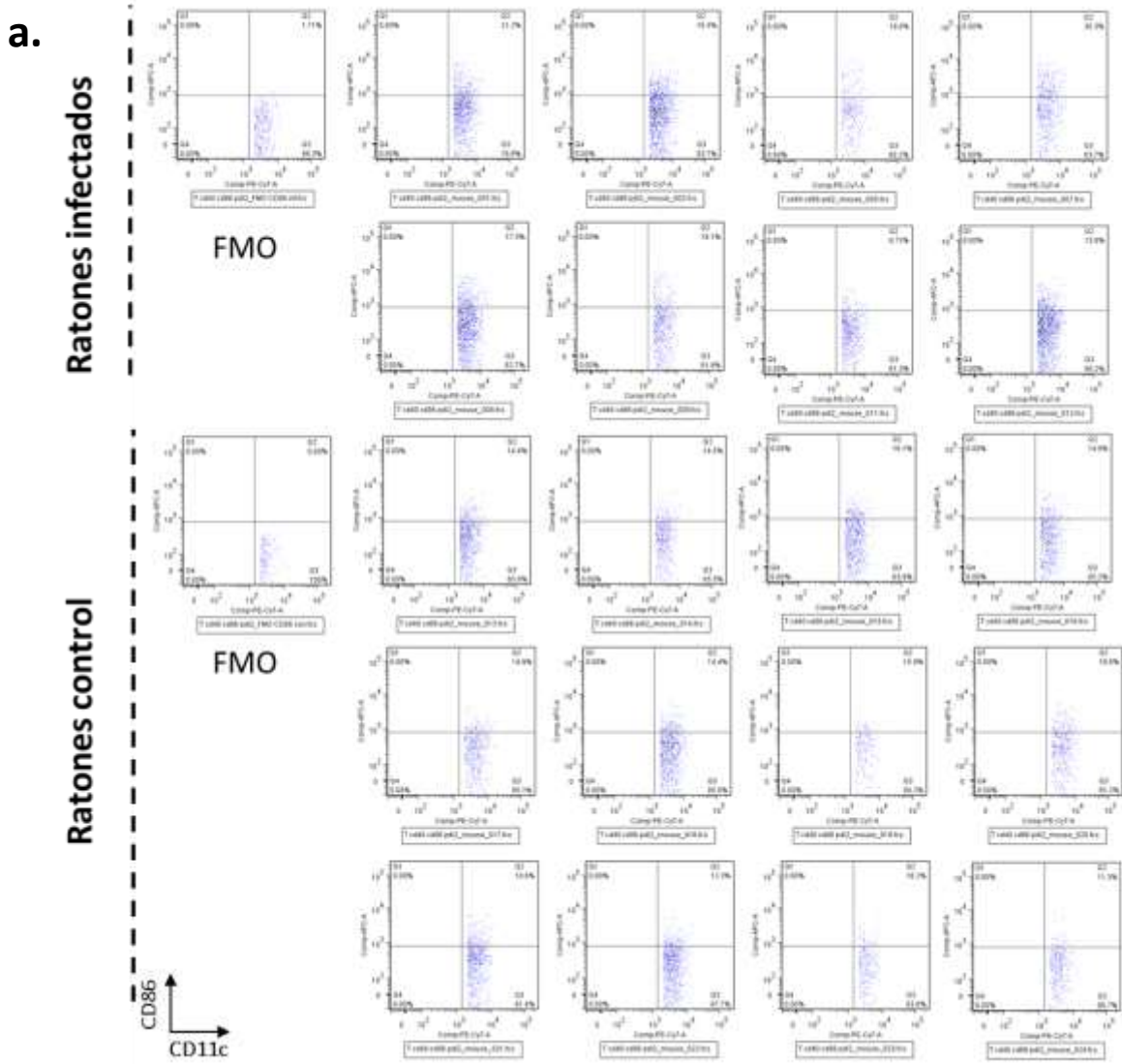
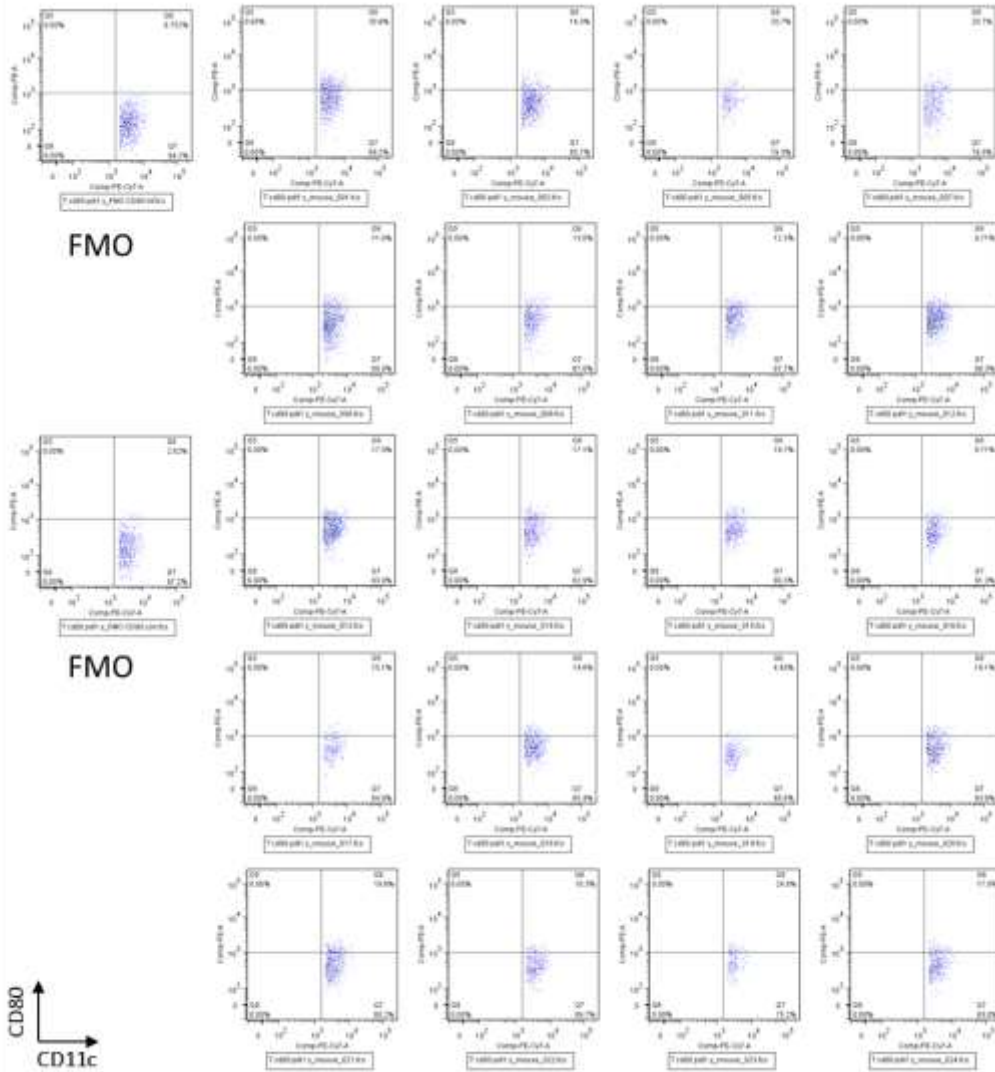


Figura 4.2.2.5. Expresión de la molécula co-estimuladora CD86 en DC de CP en infección secundaria por *E. granulosus s. I.* Se muestra la expresión de CD86 en DC de CP en forma de *dot plots* (a) y de gráfico de nivel de expresión de CD86 (media geométrica) y de porcentaje de células positivas (b). En (b) se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney (asteriscos) y el análisis paramétrico por regresión lineal con variables ficticias integrando los 3 experimentos realizados (numerales). Se muestra un experimento representativo de tres. *****/###**, $P < 0.001$; ****/##**, $P < 0.01$; ***/#**, $P < 0.05$.

a.

Ratones infectados



b.

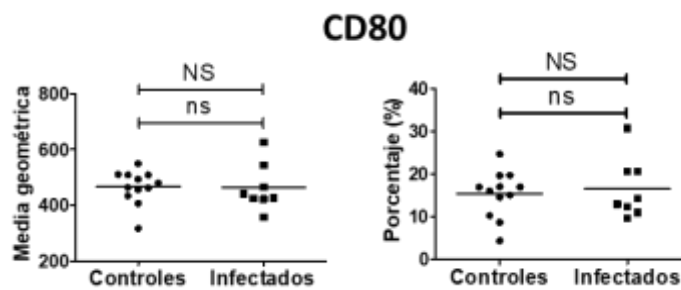
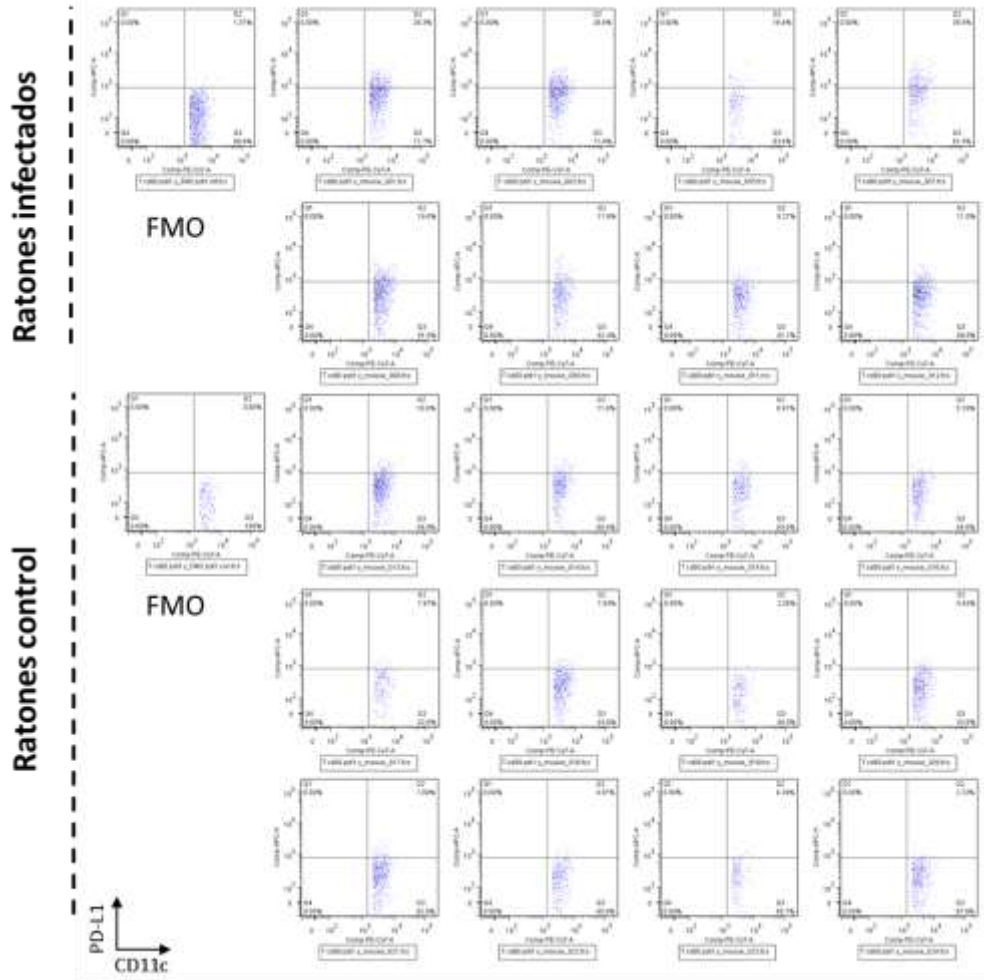


Figura 4.2.2.6. Expresión de la molécula co-estimuladora CD80 en DC de CP en infección secundaria por *E. granulosus s. I.* Se muestra la expresión de CD80 en DC de CP en forma de *dot plots* (a) y de gráfico de nivel de expresión de CD80 (media geométrica) y de porcentaje de células positivas (b). En (a) se definieron cuadrantes utilizando los controles FMO. En (b) se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney (ns) y el análisis paramétrico por regresión lineal con variables ficticias integrando los 3 experimentos (NS). Se muestra un experimento representativo de tres. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

a.



b.

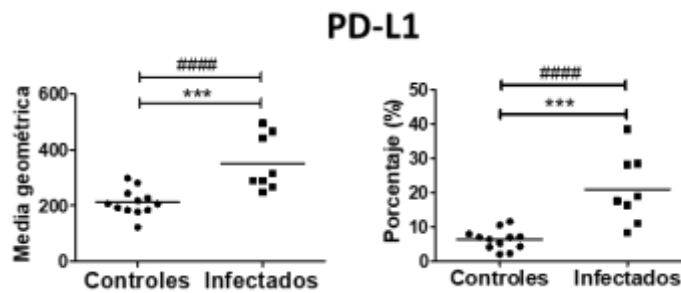


Figura 4.2.2.7. Expresión de la molécula co-inhibitoria PD-L1 en DC de CP en infección secundaria por *E. granulosus s. I*. Se muestra la expresión de PD-L1 en DC de CP en forma de *dot plots* (a) y de gráfico de nivel de expresión de PD-L1 (media geométrica) y de porcentaje de células positivas (b). En (a) se definieron cuadrantes utilizando los controles FMO. En (b) se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney (asteriscos) y el análisis paramétrico por regresión lineal con variables ficticias integrando los 3 experimentos previa transformación de los datos usando logaritmo para los datos de media geométrica ($P < 2 \times 10^{-7}$) o una función angular en el caso de los datos de porcentajes ($P < 4 \times 10^{-8}$). Se muestra un experimento representativo de tres. #####, $P < 0.0001$; ***/####, $P < 0.001$; **/###, $P < 0.01$; */#, $P < 0.05$.

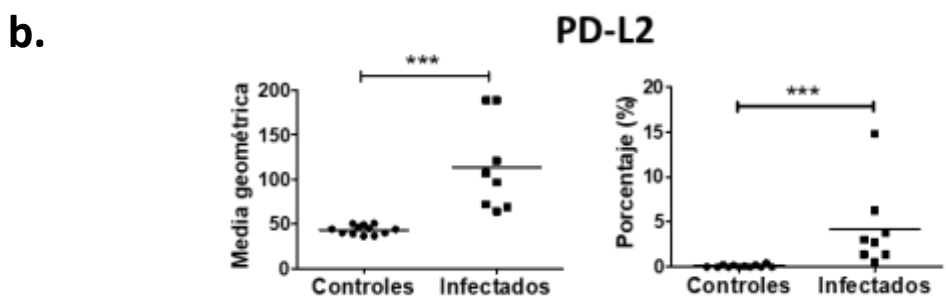
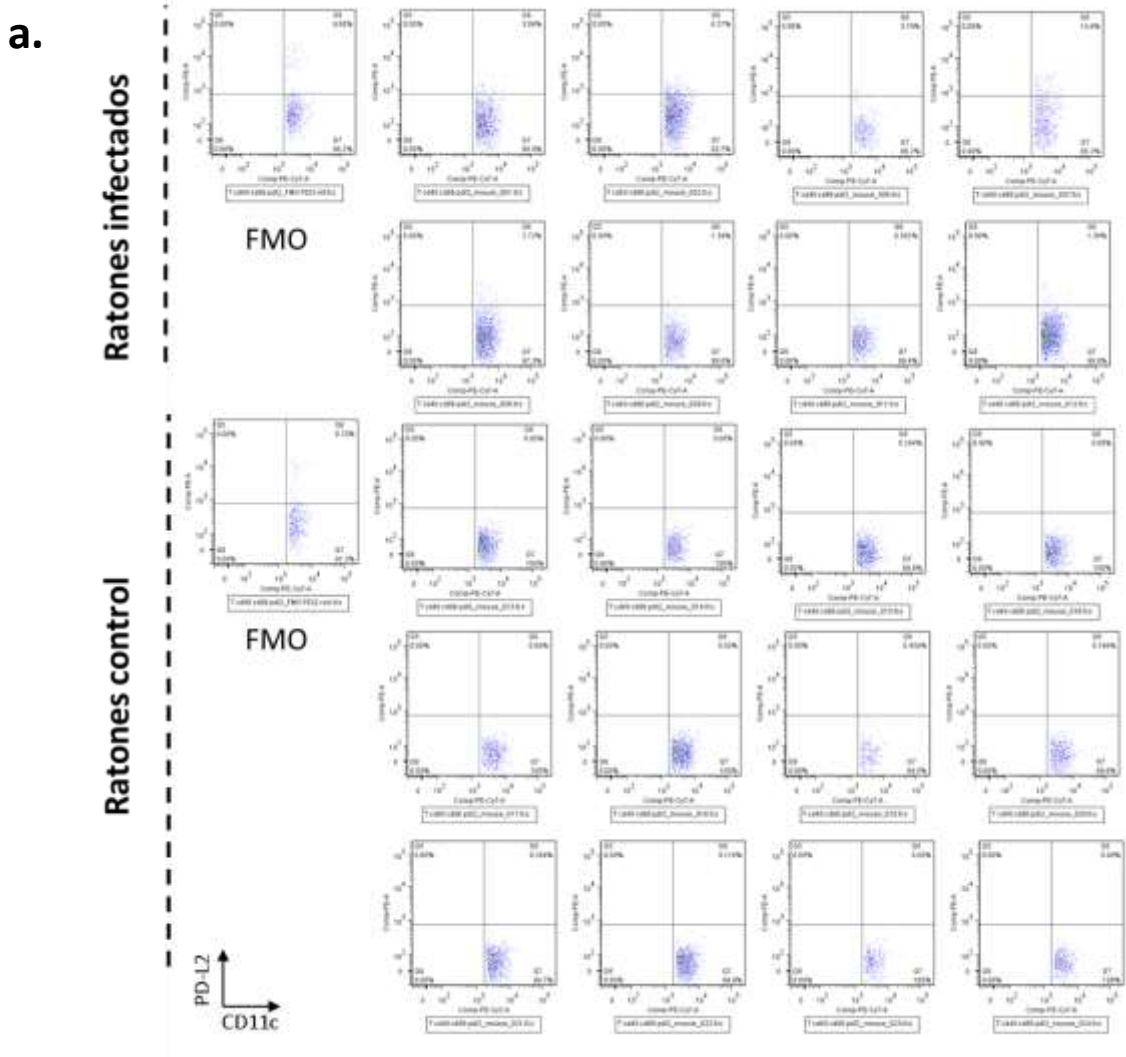


Figura 4.2.2.8. Expresión de la molécula co-inhibitoria PD-L2 en DC de CP en infección secundaria por *E. granulosus s. I*. Se muestra la expresión de PD-L2 en DC de CP en forma de *dot plots* (a), de gráfico de nivel de expresión de PD-L2 (media geométrica) y de porcentaje de células positivas (b). En (a) se definieron cuadrantes utilizando los controles FMO. En (b) se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Se muestran los datos de un único experimento. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

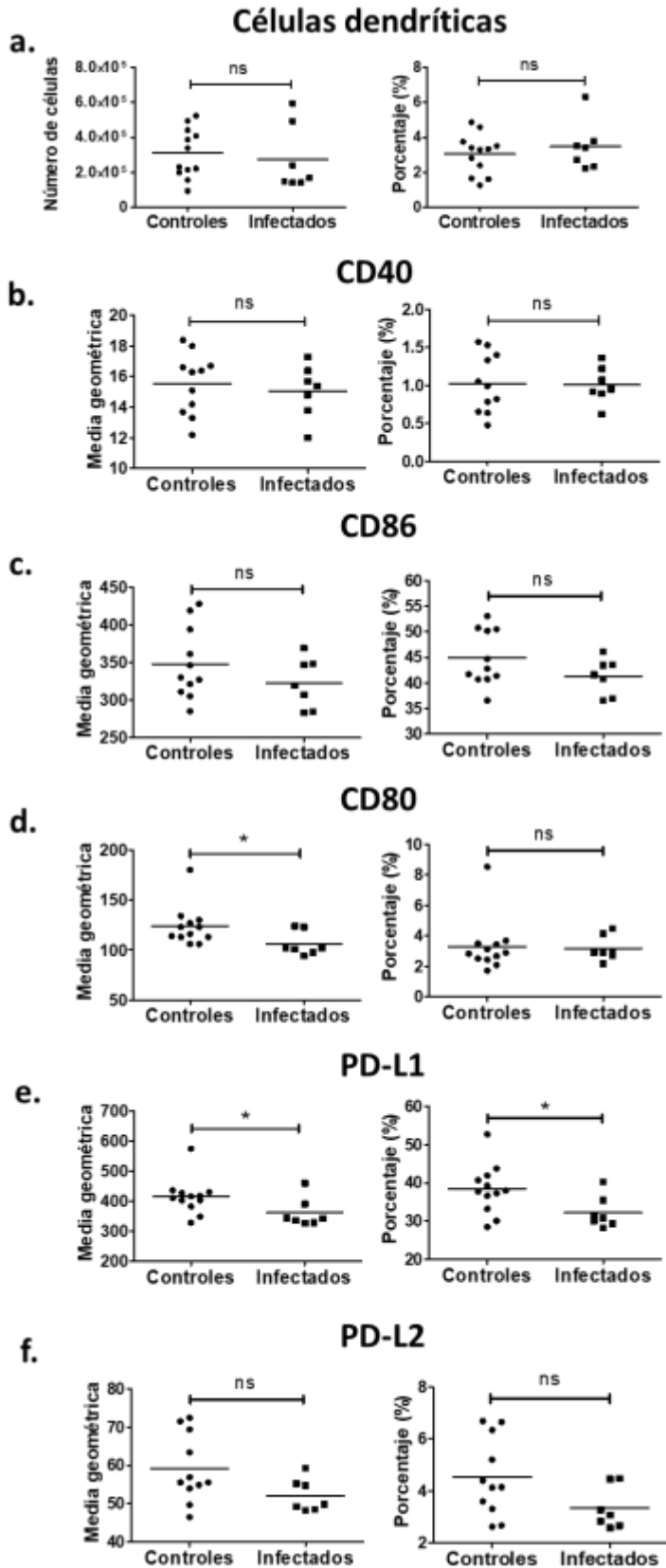


Figura 4.2.2.9. Análisis global del fenotipo de las DC de ganglio mesentérico en los ensayos de infección secundaria crónica con *E. granulosus s. l.* Se muestran los porcentajes y números totales de DC en la CP de los ratones de grupos control e infectado (a). De (b) a (f) se muestran las medias geométricas y el porcentaje de células positivas para las diferentes moléculas de superficie estudiadas: CD40 (b), CD86 (c), CD80 (d), PD-L1 (e) y PD-L2 (f). Se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

4.2.3. Estudio del fenotipo adquirido por linfocitos T en los ensayos de infección secundaria con *E. granulosus s. l.*

Analizamos los LT presentes en el sitio de infección y ganglios mesentéricos. En la Figura 4.2.3.1 se muestra la estrategia de *gating* seguida para identificar LT CD4⁺ y LT CD8⁺. En este caso la estrategia se basó en una selección inicial de aquellos eventos pertenecientes a células pequeñas y poco complejas para luego identificar a los LT según la expresión de CD4 o CD8. En la Figura 4.2.3.2 se muestran los *dot plots* correspondientes a las definiciones de dichas poblaciones celulares en la CP para el experimento que se muestra como ejemplo.

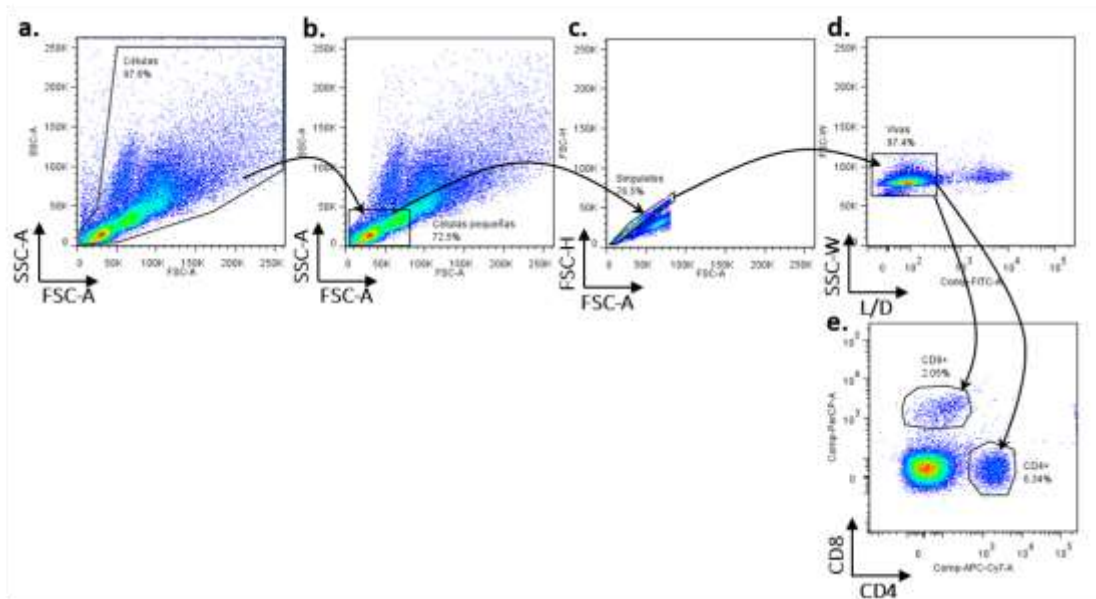


Figura 4.2.3.1. Estrategia de *gating* utilizada para definir linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en los ensayos de infección secundaria con *E. granulosus s. l.* Se muestra la estrategia de marcado y clasificación que se utilizó para definir los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de cavidad peritoneal (LT CD4⁺, LT CD8⁺). En (a) se excluyen los restos celulares, en (b) se excluyen las células grandes y complejas, en (c) se excluyen los dobletes, en (d) se excluyen las células muertas, en (e) se definen los LT CD4⁺ y CD8⁺. Se siguió la misma estrategia de *gating* para definir LT CD4⁺ y LT CD8⁺ provenientes de ganglio mesentérico.

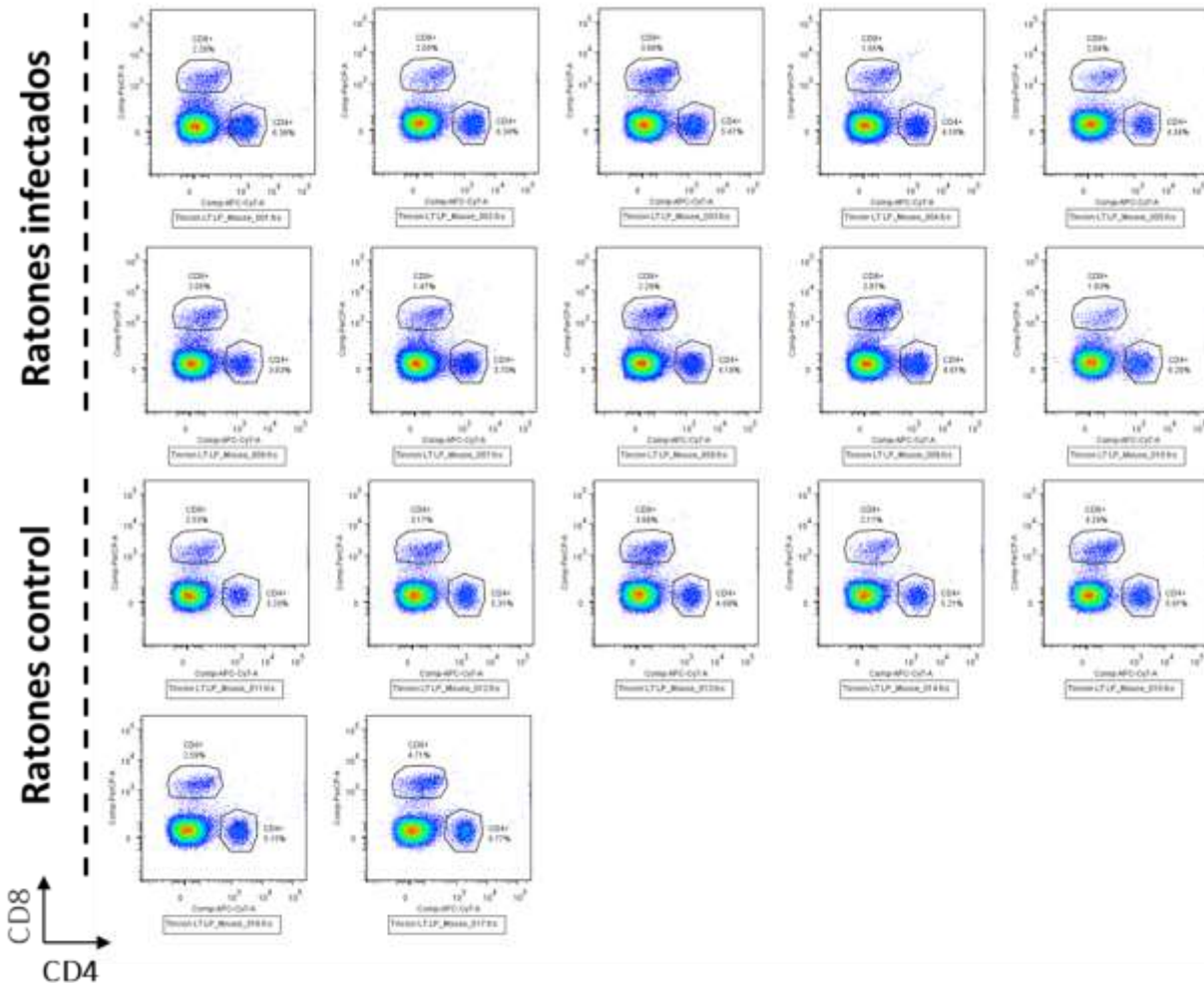


Figura 4.2.3.2. Definición de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de CP en los ensayos de infección secundaria con *E. granulosus* s. I. Los ratones infectados se inyectaron con 2000 psc, vía ip., mientras que los controles se inyectaron con PBS. Ambos grupos se sometieron a eutanasia 6 meses más tarde, durante la fase crónica de la infección y las células peritoneales se recuperaron mediante lavados peritoneales. Los gráficos son representativos de tres experimentos independientes.

Debido a que los resultados obtenidos a partir de este estudio no fueron reproducibles, decidimos mostrar los datos correspondientes a los tres experimentos realizados de forma de poder comparar los datos con mayor facilidad. En la Figura 4.2.3.3 se muestran los números de LT CD4⁺ y LT CD8⁺ en CP. Como surge de esta figura, existió variabilidad en los resultados entre los experimentos ya que el número de ambas poblaciones celulares fue mayor en las CP de ratones infectados en relación a las CP de ratones control en el caso del experimento I, mientras que no se obtuvieron diferencias significativas en estos parámetros en los experimentos II y III.

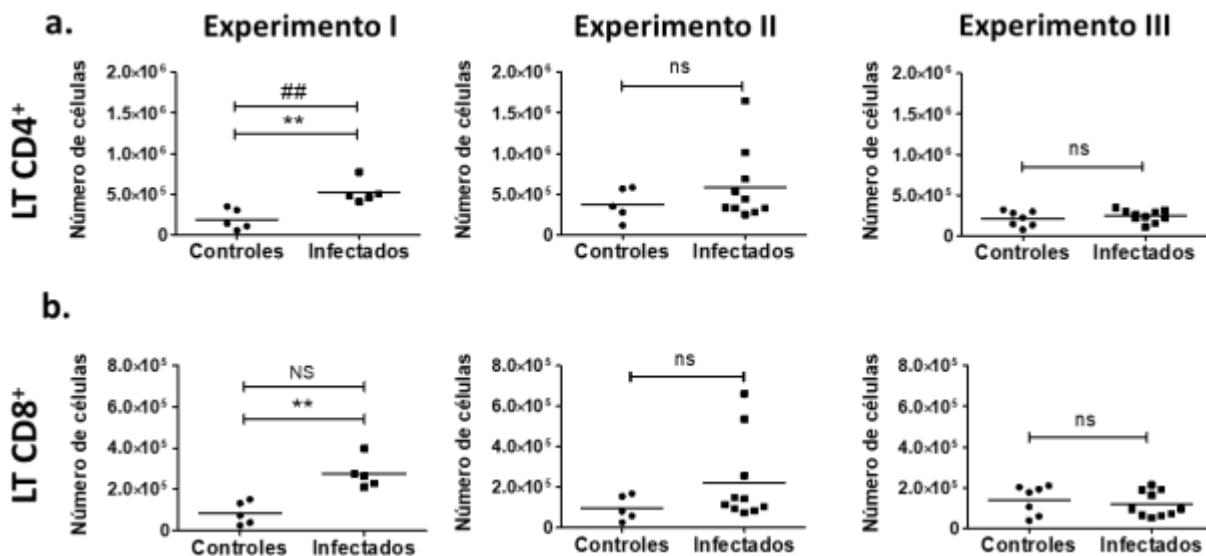


Figura 4.2.3.3. Análisis del número de LT CD4⁺ de CP en los ensayos de infección secundaria por *E. granulosus s. l.* Se muestran los números de LT CD4⁺ (a) y LT CD8⁺ (b). Se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney (asteriscos) y el análisis por regresión lineal con variables ficticias integrando los 3 experimentos realizados (numerales y NS en las primeras gráficas de la izquierda). ###/***, $P < 0.001$; ##/**, $P < 0.01$; #/*, $P < 0.05$.

Los antecedentes en inmunología de helmintos sugieren que uno de los elementos que puede contribuir a la capacidad de *E. granulosus s. l.* de establecer infecciones crónicas es la expansión de LT reguladores y, en particular, de aquellos que expresan el factor de transcripción FoxP3 (LT CD4⁺ o CD8⁺ FoxP3⁺)¹⁰⁸. El estudio de la expresión de FoxP3⁺ en LT CD4⁺ y CD8⁺ se muestra en la Figura 4.2.3.4. Mientras la población de LT CD4⁺ FoxP3⁺ fue claramente identificable, en ningún experimento se observó una población de LT CD8⁺ FoxP3⁺. En la Figura 4.2.3.5 se resume la cuantificación de la expresión de FoxP3 en LT CD4⁺. El número de LT CD4⁺ FoxP3⁺ no mostró cambios estadísticamente significativos en respuesta a la infección en ninguno de los experimentos. En la parte (b) de la misma figura se muestra el nivel de expresión de FoxP3 en la población de LT CD4⁺ que expresa dicha molécula (población FoxP3⁺); se observa que el nivel de expresión de FoxP3 fue significativamente mayor en ratones infectados sólo en el experimento III. Vale aclarar que además se intentó determinar la expresión de CD25 (por estar esta molécula muy representada en los LT_{reg}) pero no fue posible debido a problemas técnicos.

a. Experimento I

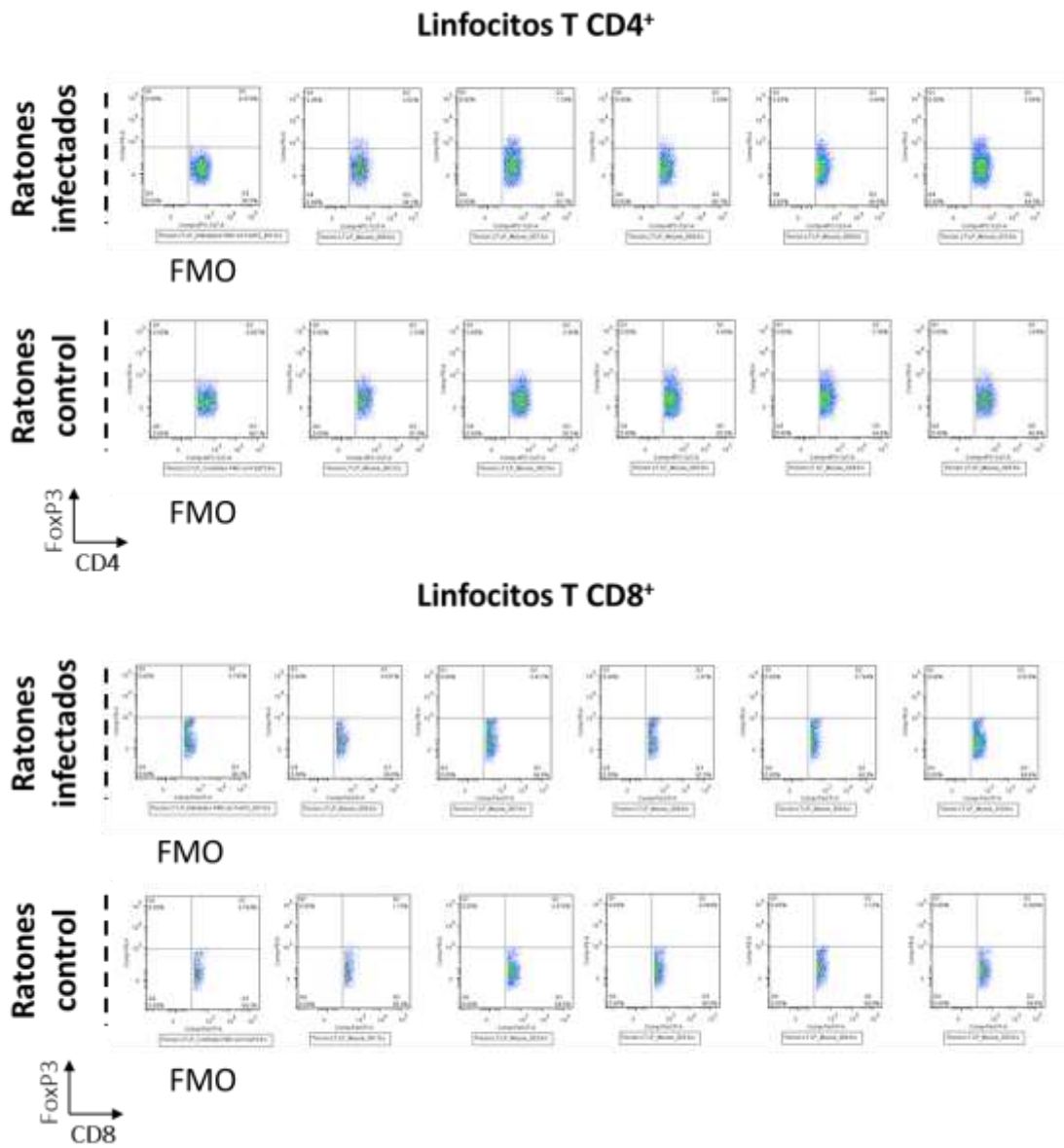
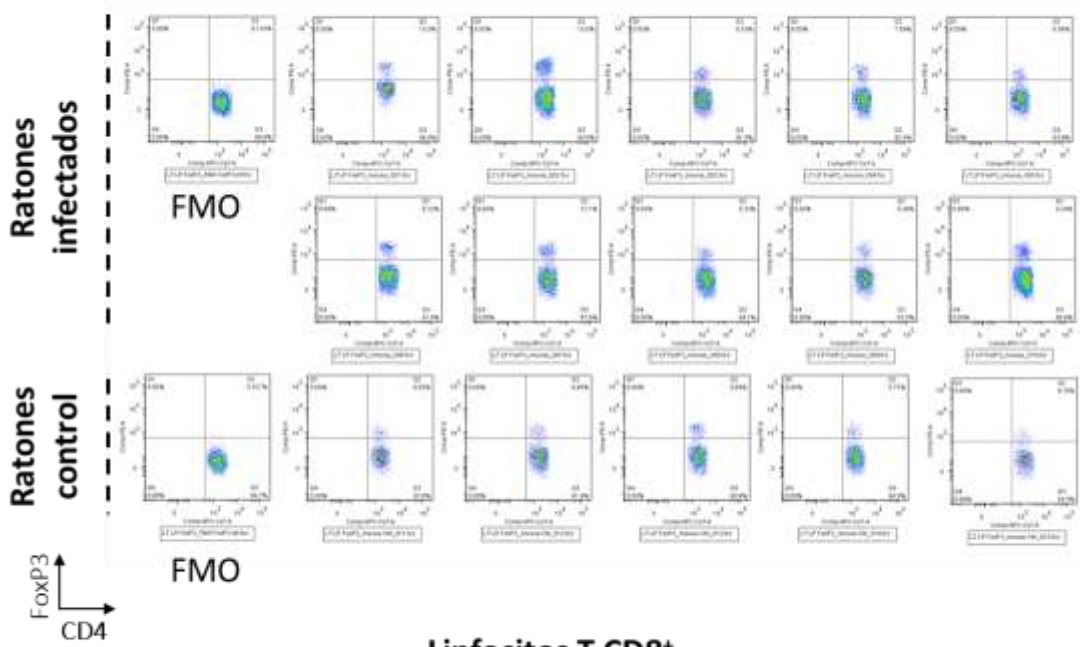


Figura 4.2.3.4. Ver leyenda en la página 83.

b. Experimento II

Linfocitos T CD4⁺



Linfocitos T CD8⁺

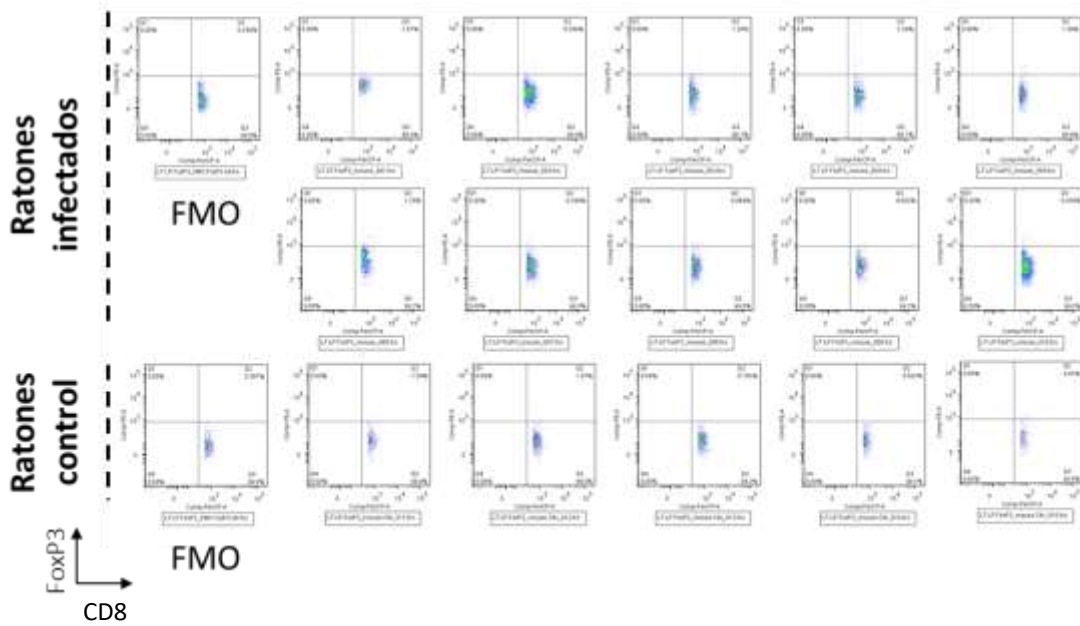


Figura 4.2.3.4. Ver leyenda en la página 83.

c Experimento III

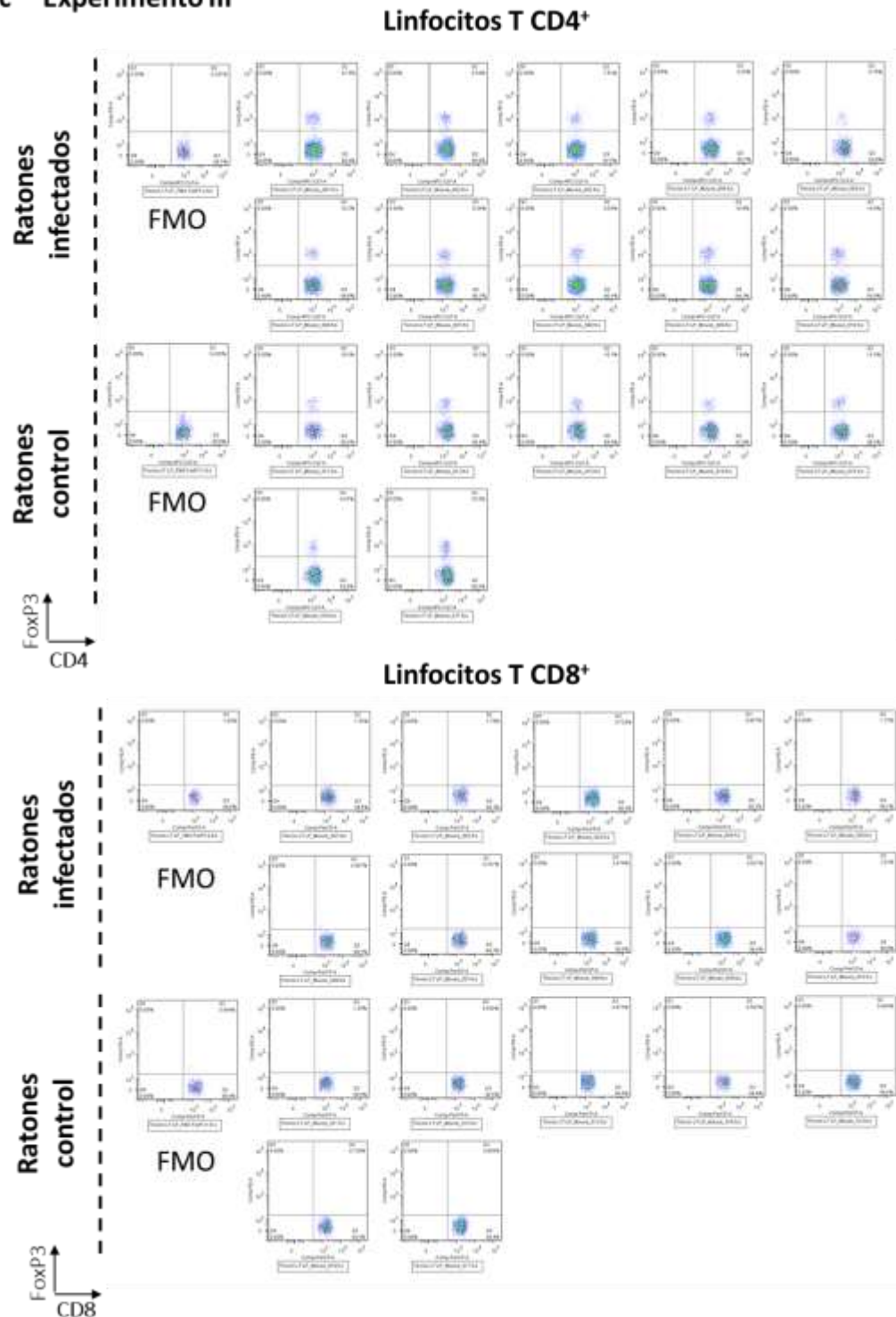


Figura 4.2.3.4. Expresión del factor de transcripción FoxP3 en LT CD4⁺ y CD8⁺ de CP en los ensayos de infección secundaria con *E. granulosus* s. I. Se muestra la definición de LT CD4⁺ y LT CD8⁺ para tres experimentos independientes (experimento I (a), II (b) y III (c)). Los cuadrantes se definieron utilizando los controles FMO mostrados para cada experimento.

LT CD4⁺ FoxP3⁺

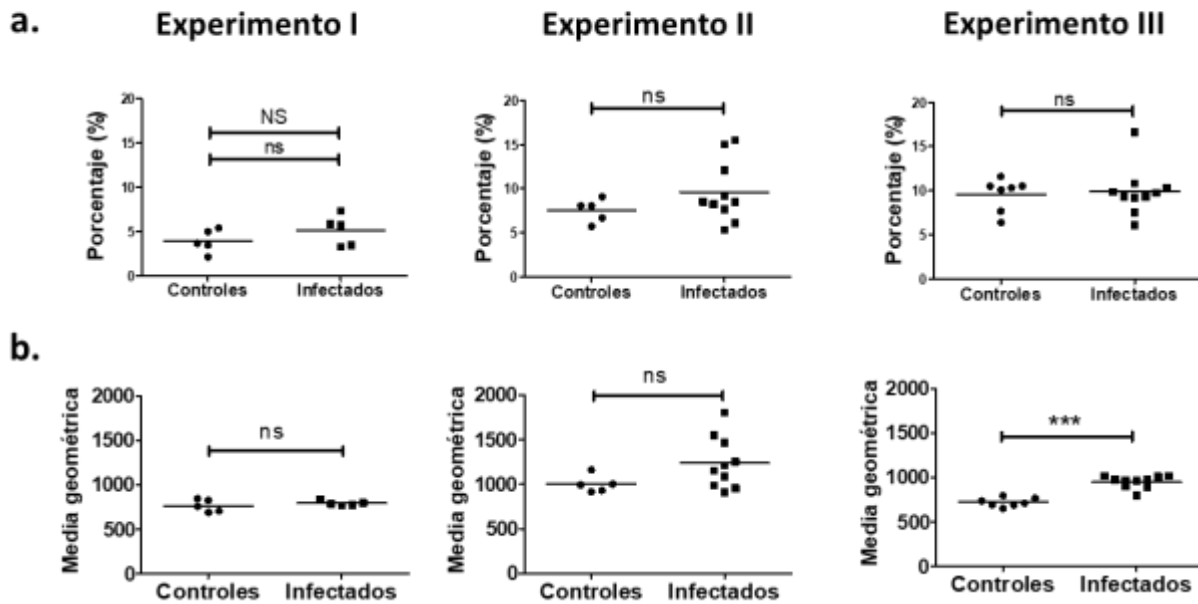


Figura 4.2.3.5. Estudio de la expresión de FoxP3 en LT CD4⁺ de CP en los ensayos de infección secundaria con *E. granulosus* s. I. Se muestra el porcentaje de LT FoxP3⁺ en la población CD4⁺ (a) y el nivel de expresión de FoxP3 en la población de LT CD4⁺ FoxP3⁺ (b) de tres experimentos independientes. Se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney. En (a) se aplicó, además, el análisis de dos vías por regresión lineal con variables ficticias integrando los 3 experimentos realizados, los resultados se indican en la gráfica de la izquierda con NS. En (b) no fue posible aplicar el análisis paramétrico de dos vías debido a que el test de Levene (de homogeneidad de varianzas) rechaza la aplicación del análisis. ***, P < 0.001; **, P < 0.01; *, P < 0.05.

Finalmente, en la Figura 4.2.3.6. se muestran los números de LT CD4⁺ y CD8⁺ totales, y CD4⁺ FoxP3⁺, de LT de ganglios mesentéricos (Ver Anexo 8.2). Vale aclarar que estos datos provienen de un único experimento realizado. Como se ve, los números de LT CD4⁺ y LT CD8⁺ no mostraron diferencias estadísticas entre los ratones controles e infectados, así como tampoco se vieron diferencias estadísticamente significativas en los números de LT CD4⁺ y CD8⁺ FoxP3⁺ entre los ratones controles e infectados.

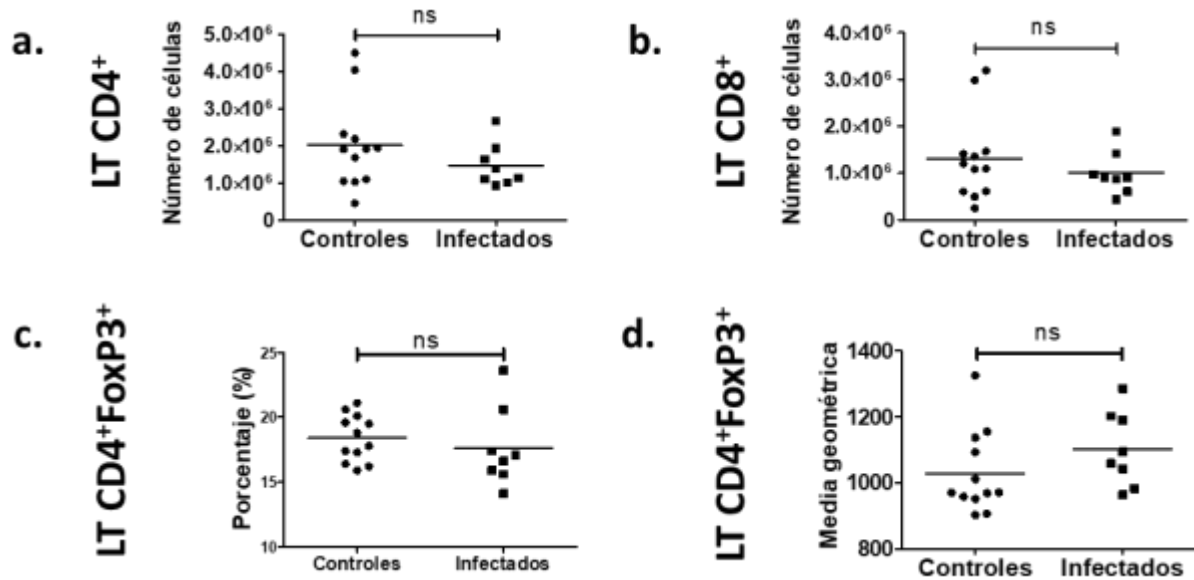


Figura 4.2.3.6. Estudio de los LT CD4⁺ y CD8⁺ de ganglio mesentérico en los ensayos de infección secundaria con *E. granulosus s. l.* Se muestra el número de LT CD4⁺ (a) y LT CD8⁺ (b), el porcentaje de LT CD4⁺FoxP3⁺ (c) y el nivel de expresión de FoxP3 en la población de LT CD4⁺FoxP3⁺ (d). Los datos corresponden a un único experimento. Para el análisis de los datos se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney. ***, P < 0.001; **, P < 0.01; *, P < 0.05.

4.2.4. Estudio de la respuesta de los linfocitos T desencadenada por la infección secundaria crónica con *E. granulosus s. l.*

Finalmente, exploramos la respuesta de los linfocitos T desencadenada frente a la infección secundaria con *E. granulosus s. l.*, en términos de producción de citoquinas. Para ello realizamos ensayos utilizando LH como mezcla antigénica de re-estimulación de clones de LT amplificadas durante la infección. Además, evaluamos posibles efectos del condicionamiento de células presentadoras de antígeno por pLL en los experimentos de re-estimulación con LH.

La respuesta de LT provenientes de ganglio mesentérico o bazo a LH se evidenció mediante la medida de citoquinas típicas de cada una de las ramas de la respuesta adaptativa, *i.e.* IL-5, IL-13 e IL-4 (T_H2), IL-10 (componente importante de las respuestas reguladoras), IL-17 (T_H17) e IFN-γ (T_H1). Como se muestra en la Figura 4.2.4.1 existe una respuesta específica de antígeno en términos de IL-5 e IL-13 en las células de ganglios y bazo, y de IFN-γ sólo en ganglios

mesentéricos. Dicha respuesta no es modificada por la presencia de pLL durante la re-estimulación *ex vivo*. Con respecto a la IL-10, se observó que en las muestras de ganglio mesentérico dicha secreción es, probablemente, innata ya que no se observan diferencias entre los grupos de ratones control e infectados. Sin embargo, en bazo, la secreción de IL-10 posee además un factor adaptativo, evidenciado por la presencia de una diferencia estadísticamente significativa entre los ratones control e infectados re-estimulados con LH. Como se ve, la secreción de IL-10 tampoco se vio afectada por la presencia de pLL durante la re-estimulación. Con respecto a la secreción de IL-17 en las muestras de ganglio mesentérico se observó que existe una secreción innata de dicha citoquina, probablemente acompañada de un componente adaptativo (esta última interpretación se basa en una tendencia al aumento de su secreción por parte de los ratones infectados con respecto a los ratones control, que no es estadísticamente significativa). La presencia de pLL durante la re-estimulación no afectó la secreción de IL-17 por parte de las células de ganglio mesentérico. Finalmente, la secreción de IL-17 por parte de las células de bazo sería de origen innato, ya que no es diferente entre ratones control e infectados. En este caso, la presencia de pLL durante la re-estimulación potenció la secreción de IL-17 por parte de las células de los ratones control e infectados, aunque en este último caso lo hizo en menor medida.

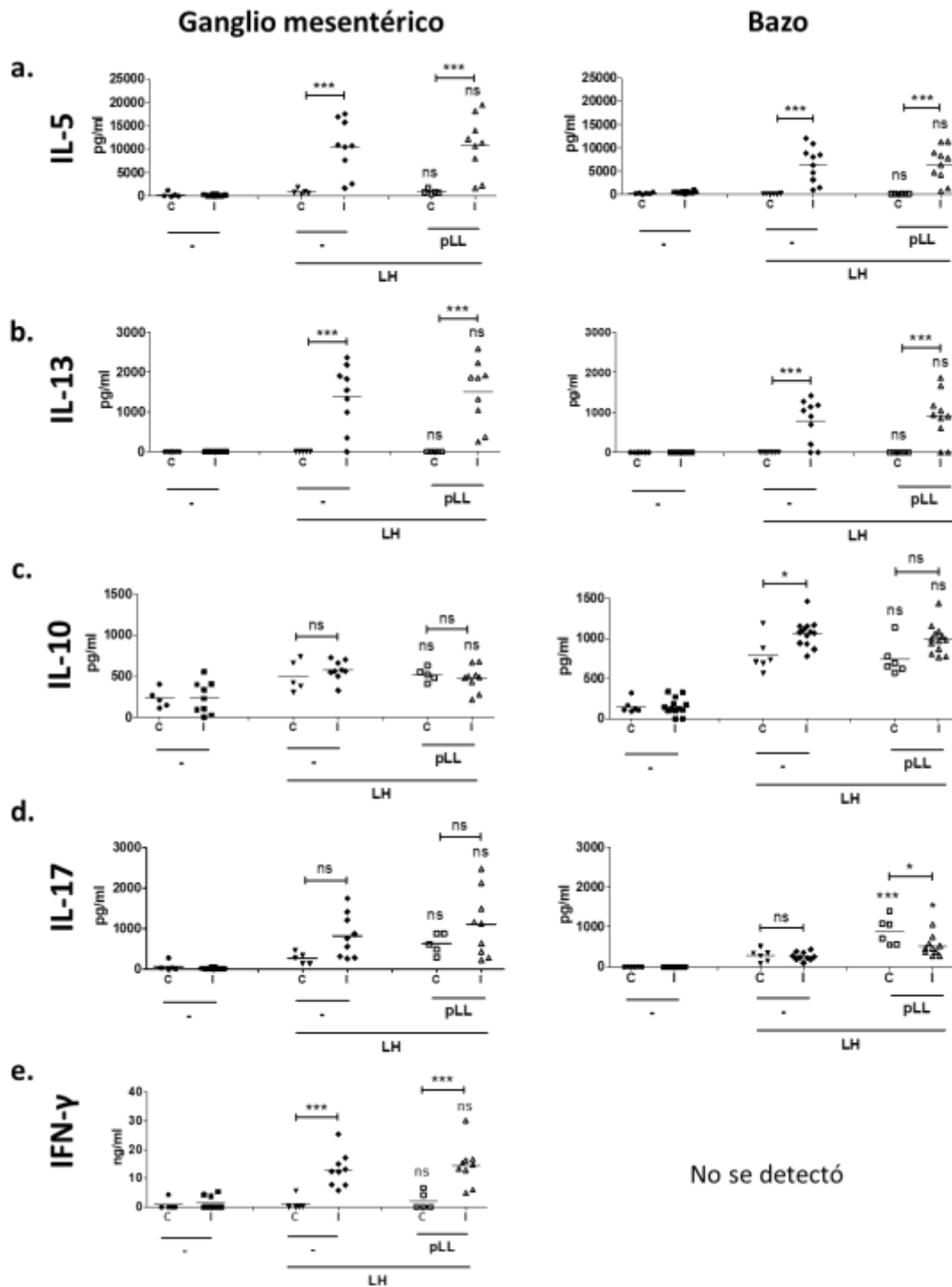


Figura 4.2.4.1. Estudio de la respuesta de células de ganglio mesentérico y bazo, a la re-estimulación con LH y al condicionamiento por pLL, en ensayos de infección secundaria crónica con *E. granulosus*. *I.* Las células provenientes de ganglios mesentéricos (1×10^6 células/pocillo) o bazo (2×10^6 células/pocillo) fueron re-estimuladas *ex vivo* con líquido hidático (LH, dilución final 1:1 (v/v) en relación al LH original ver Sección 3.3.1.) sólo, o en presencia de pLL (20 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células), durante 72 hs. Se midieron los niveles de IL-5 (a), IL-13 (b), IL-10 (c), IL-17 (d) e IFN- γ (e) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Se muestran los

datos de un experimento representativo de 2 experimentos independientes para los casos de re-estimulación con LH y los datos de un único experimento en el caso de la co-estimulación con pLL+LPS. Con asterisco y ns se indican las diferencias estadísticas encontradas mediante el test paramétrico ANOVA de una vía con post-test Tukey, para el cual los datos de (a), (b), (d) y (e) fueron transformados usando logaritmo para eliminar sesgo y/o hacer más homogéneas las dispersiones. Las significancias indicadas sobre los tratamientos con LH corresponden a diferencias con los grupos correspondientes en presencia de medio solamente y, las indicadas sobre los tratamientos con pLL+LH corresponden a diferencias con los grupos correspondientes en presencia de LH solamente ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

5. Discusión

5.1. Mecanismos de condicionamiento celular mediado por partículas de LL

En este trabajo profundizamos en el estudio de los mecanismos que median los efectos de las partículas de LL sobre BMDC. En particular, estudiamos la dependencia del contacto entre las células y las partículas para la inducción del fenotipo semi-maduro (Figura 4.1.1.1), así como la relevancia de la fagocitosis en la inducción de dicho fenotipo (Figura 4.1.2.3). Encontramos que, mientras que el condicionamiento celular es independiente de la fagocitosis, el contacto entre las células y las partículas, a nivel de célula individual, es imprescindible para la inducción del fenotipo completo. Además, observamos que, en presencia de LPS, existen mediadores difusibles secretados por las células en contacto con las partículas que moderan la respuesta al LPS. En la siguiente sección profundizaremos en la discusión de algunos aspectos de estos resultados que consideramos de mayor importancia.

5.1.1. Condicionamiento de BMDC por pLL: análisis de mecanismos dependientes e independientes de contacto

Resultados previos del grupo mostraron que los efectos de pLL no están mediados por componentes solubles que se desprendan de las partículas, ya que si las mismas son separadas de las BMDC por insertos *trans-well*, el fenotipo semi-maduro no se observa⁶⁷. En otras palabras, la población celular debe estar en contacto con las partículas de pLL para que se induzca el fenotipo semi-maduro (Figura 4.1.1.1). Sin embargo, desconocíamos si era indispensable que cada célula contactase las partículas, o si era suficiente que sólo algunas de ellas lo hicieran para inducir el fenotipo semi-maduro en células que no contactasen a las partículas, a través de algún mecanismo de comunicación celular, como la secreción de factores parácrinos (FP) o la liberación de vesículas extracelulares (VE). Nuestros resultados provenientes de experimentos utilizando insertos *trans-well* demostraron que la potenciación de la expresión de CD86 por pLL, tanto en ausencia como en presencia de LPS, depende del contacto de las células individuales con las

partículas. Además, vimos que dicha potenciación, en presencia de LPS, ocurre a pesar de mediador(es) difusible(s) con el efecto contrapuesto, liberado(s) por las BMDC que contactan las partículas. En otras palabras, en presencia de pLL y de LPS, el nivel de expresión de CD86 refleja la sumatoria de: (i) el efecto positivo del LPS, (ii) el efecto positivo y dependiente de contacto de pLL, y (iii) el efecto negativo de un factor difusible liberado en respuesta al co-estímulo con pLL y LPS. En estos experimentos también observamos que el efecto de pLL sobre la expresión de CD40 en presencia de LPS se transmitió en forma cuantitativamente atenuada a las células que no contactan a las partículas. Así, podemos decir que en presencia de pLL y LPS, el nivel de expresión de CD40 refleja la sumatoria de: (i) el efecto positivo del LPS, (ii) el efecto negativo y dependiente de contacto de pLL, y (iii) el efecto negativo de un factor difusible liberado en respuesta al co-estímulo con pLL y LPS. Ya que los efectos de los factores difusibles sobre la expresión de CD86 y CD40 son ambos inhibitorios, podrían deberse a la acción del mismo (o los mismos) factor(es) difusible(s).

En este trabajo investigamos el papel de un mediador inhibitorio candidato: la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Encontramos que la IL-10 modera la inducción de CD86 en presencia de LPS, tanto en ausencia como en presencia de pLL, por lo que no es responsable de la inhibición de CD86 observada en las células del compartimento superior en la condición particular de pLL+LPS (Figuras 4.1.1.2 y 4.1.1.4). En cuanto a la expresión de CD40, no encontramos, en nuestro sistema experimental, efectos de la IL-10 (Figuras 4.1.1.3 y 4.1.1.4). Sin embargo, *Bhattacharyya S. y cols. (2004)*¹⁰⁹ señalan que la IL-10 inhibe la inducción de CD40 en BMDC. La diferencia entre sus resultados y los nuestros probablemente radiquen en el hecho de que en nuestros cultivos la IL-10 (producida en respuesta a la estimulación con pLL+LPS) alcanza como máximo 8 ng/ml, en comparación con 50 ng/mL de IL-10 exógena (durante 24 hs), empleada por *Bhattacharyya S. y cols.* Así, los efectos de la IL-10 sobre la expresión de CD40 serían dependientes de dosis y estarían ausentes en nuestro modelo de estudio. Finalmente, y de acuerdo con los descrito previamente en la literatura¹⁰³, observamos que la IL-10 inhibe la secreción de IL-12 (tanto de la subunidad IL-12/23p40 como de la IL-12p70) en respuesta a LPS (Figura 4.1.1.5).

En suma, nuestros resultados muestran que los efectos observados en las células que no contactan pLL no dependen de IL-10; entonces, ¿qué otro(s) factor(es) difusible(s) podría(n) estar

mediando dichos efectos? Pensamos que buenos candidatos podrían ser TGF- β o la prostaglandina E2 (PGE₂).

TGF β es una molécula con efectos moduladores del sistema inmune. Las células del sistema inmune, incluidas las DC, son capaces de sintetizar la isoforma 1 de TGF- β , en forma de pro-péptido que debe ser activado para ejercer sus funciones biológicas. Los efectos anti-inflamatorios de esta citoquina han sido ampliamente demostrados mediante experimentos de eliminación de la citoquina, o de sus receptores, intervenciones que dan lugar a la inducción de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Sin embargo, más recientemente se ha visto que en otros contextos y en conjunto con otras citoquinas, TGF- β también puede ejercer efectos pro-inflamatorios¹¹⁰. Sobre DC específicamente, TGF- β ejerce importantes efectos, promoviendo o inhibiendo las respuestas de estas células, incluyendo la inducción de DC tolerogénicas en colaboración con IL-10¹¹¹. En BMDC, en particular, el pre-tratamiento con TGF- β inhibe el aumento en la expresión de CD80, CD86 o CD40 en respuesta a LPS^{112,113}. Además, se ha observado que TGF- β potencia la secreción de IL-10 e inhibe la de IL-12 en BMDC¹¹⁴. Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados en términos de la moderación de la expresión de CD86, de la inhibición de la expresión de CD40, de la potenciación de la secreción de IL-10 y de la inhibición de IL-12. Por lo tanto, es lógico plantear que las BMDC estimuladas con pLL+LPS podrían producir TGF- β . Esta hipótesis toma más relevancia si se considera que TGF- β juega, además, un papel fundamental en la inducción de LT T_H17, como se discutirá más adelante.

Otro factor difusible candidato a mediar los efectos fenotípicos observados en las BMDC que no contactan las partículas es la PGE₂. PGE₂ es una pequeña molécula lipídica que funciona como moduladora de las respuestas inmunes gracias a sus efectos sobre la función de APC^{115,116}. Diversos parásitos la utilizan como mecanismo de evasión inmunológica, ya sea por producción directa o por condicionamiento de células del hospedero^{117,118}. La producción de PGE₂ está catalizada por la prostaglandina G/H sintasa (conocida más comúnmente como ciclooxigenasa 2, COX2). En BMDC, la activación por LPS induce la expresión de COX2¹⁰³. En este modelo, NS398, un inhibidor de la COX2, potencia la expresión de CD80, CD86 y MHCII (aunque no altera la expresión de CD40), lo que pone de manifiesto los efectos inmunoreguladores (autócrinos/parácrinos) de la PGE₂. Además, la adición exógena de PGE₂ a BMDC, en presencia

de LPS, potencia la producción de IL-10, IL-23 e IL-1 β , e inhibe la de TNF- α , IL-6 e IL-12p70¹¹⁹. Considerando las coincidencias entre los efectos de la adición de PGE₂ a las BMDC y el condicionamiento por factores difusibles provenientes BMDC en contacto con pLL, podemos postular que las partículas de LL podrían inducir la producción de PGE₂ en las BMDC.

Finalmente, otro mecanismo de comunicación celular que podría explicar nuestros hallazgos de condicionamiento celular a distancia es la secreción de vesículas extracelulares (VE). Dicho mecanismo ha sido ampliamente descrito para las células del SI, incluidas las DC^{120,121}. Las VE pueden transportar moléculas de cualquier naturaleza química, capaces de modificar el fenotipo/función de células distantes a las que las produjeron. Si bien varios estudios señalan las capacidades inmunoinhedoras de VE provenientes de DC inmaduras en términos de la inhibición de la proliferación de LT, es lógico pensar que las VE también podrían tener efectos sobre otras DC^{122,123}. Pero, ¿cuáles podrían ser las moléculas transportadas por las VE responsables de inducir el fenotipo descrito para las DC que no contactan las partículas? Pensamos que dichas moléculas podrían ser aquellas involucradas en la señalización intracelular que media los efectos de la co-estimulación con pLL+LPS en las BMDC. En este sentido, nuestro grupo demostró la importancia de la forma activa (desfosforilada) de la quinasa GSK-3 (blanco de AKT, a su vez blanco de PI3K)¹²⁴ en la inhibición de la expresión de CD40 en BMDC¹²⁵. El mismo mecanismo podría explicar la inhibición de la expresión de CD86, ya que se ha visto que GSK-3 activa también inhibe la expresión de dicha molécula. Por lo tanto, VE conteniendo GSK-3 activa podrían, en teoría, transmitir los efectos sobre CD40 y CD86 a las células que no están en contacto con pLL.

Existe otra posibilidad, que integra la hipótesis de las VE con la que involucra a la PGE₂ como el factor difusible responsable de los efectos. Se conoce que los efectos de PGE₂ sobre sus células diana están mediados por aumento de la concentración intracelular de adenosín monofosfato cíclico (AMPC); de hecho, los estímulos que aumentan los niveles intracelulares de dicha molécula imitan los efectos de la PGE₂¹²⁶. Por lo tanto, se puede postular que las células en contacto con pLL podrían liberar VE que contengan AMPC, o moléculas clave para su inducción, capaces de reproducir los efectos de la señalización por PGE₂.

Los efectos dependientes e independientes del contacto de las células con las partículas discutidos en esta sección se resumen en la Figura 5.1.1.

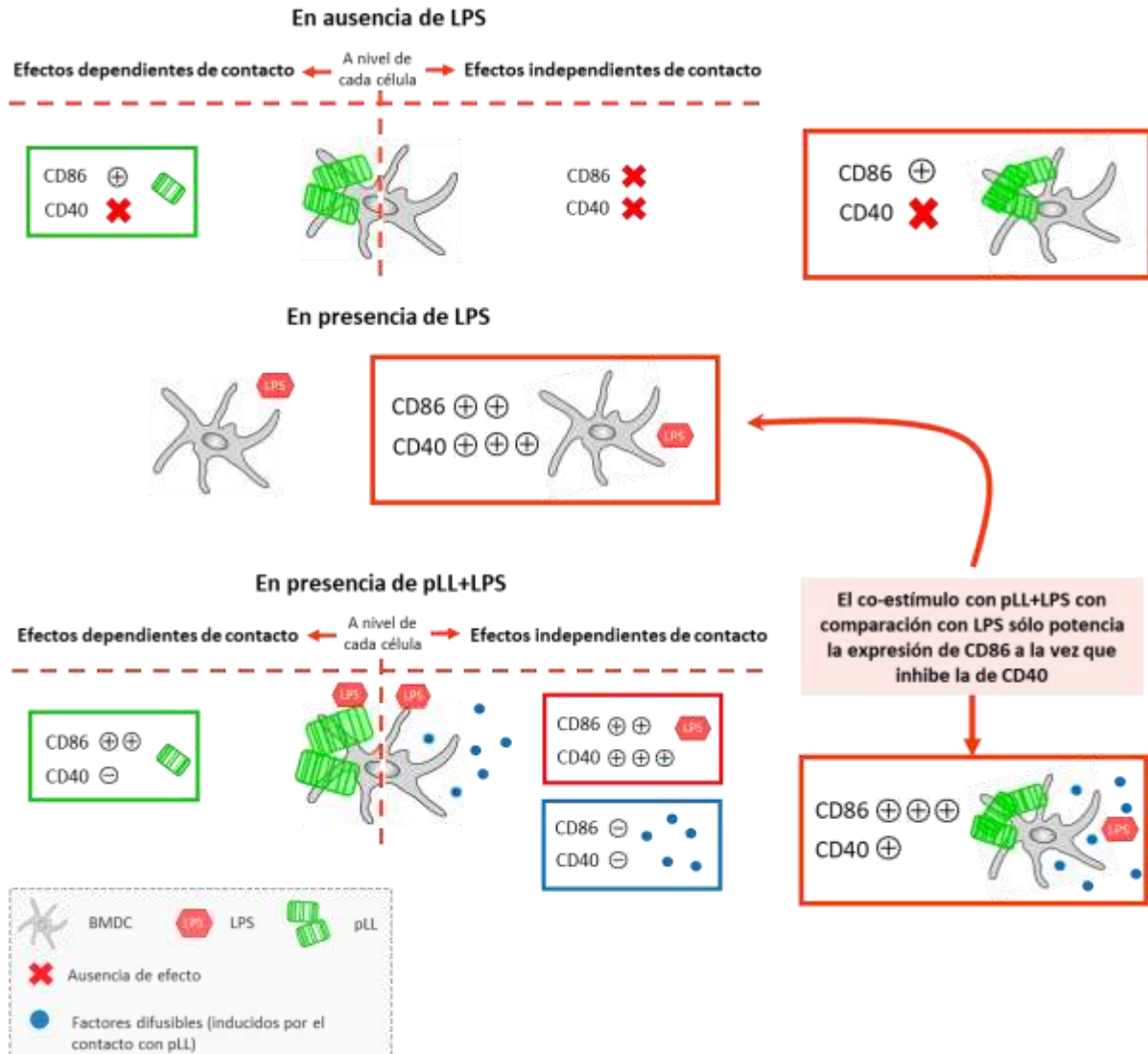


Figura 5.1.1. Análisis de los mecanismos del condicionamiento de BMDC por pLL. La inducción del fenotipo semi-maduro resulta de la sumatoria de efectos directos del contacto de las células con las partículas y efectos indirectos mediados por factores difusibles liberados por las BMDC en contacto con las partículas (en presencia de LPS).

En suma, nuestros experimentos mostraron que la inducción del fenotipo semi-maduro depende no sólo de mecanismos mediados (directamente) por el contacto entre las células y las partículas, sino que además de la existencia de mediador(es) difusibl(es) liberado(s) por dichas

células (cuya secreción también es dependiente del contacto con pLL). En este trabajo demostramos, además, que la IL-10 no es uno de dichos mediadores solubles.

5.1.2. Estudio del papel de la fagocitosis sobre la inducción del fenotipo semi-maduro por partículas de LL sobre BMDC

Resultados previos del grupo indican que el inhibidor de la dinámica del citoesqueleto de actina, citocalasina D, elimina los efectos de pLL sobre BMDC^{104,67}, lo que sugiere que un contacto íntimo entre las células y las partículas, análogo a la “sinapsis fagocítica” pero que podría llevar a fagocitosis efectiva o constituir una fagocitosis frustrada, sería un evento primordial para el condicionamiento celular. Para dilucidar si los efectos de pLL son realmente dependientes de la fagocitosis, comenzamos a trabajar con pLL^{NP}, una preparación de partículas de LL de tamaño no fagocitable. Nuestros resultados condicionando BMDC con pLL^{NP} reprodujeron aquellos observados utilizando pLL, tanto en ausencia como en presencia de inhibidores de PI3K y del citoesqueleto de actina, por lo que demostramos que los efectos de las partículas de LL sobre las BMDC no requieren de su fagocitosis (Figuras 4.1.2.3 y 4.1.2.4).

Como se mencionó en la introducción de esta Tesis, la oxidación de los carbohidratos que constituyen las mucinas de la LL no afecta la inducción del fenotipo semi-maduro⁶⁷. Con respecto a la porción proteica de las mucinas, el fenotipo no se vio afectado por el tratamiento de las partículas con una proteasa, ni se pudieron reproducir los efectos de pLL mediante la estimulación de BMDC con un péptido sintético cuya secuencia fue deducida a partir del transcriptoma del parásito, y que constituiría el extremo N-terminal no glicosilado de una de las apomucinas con mayor nivel de expresión en la hidátide (*Pittini Á, resultados no publicados*). Tampoco se han encontrado motivos glucídicos en la LL que sean reconocidos por CLR, a excepción del receptor Clec4F, presente en ratones únicamente en las células de Kupffer^{127,128}. Sin embargo, la reducción de puentes disulfuro mediante el tratamiento con DTT (que afecta características fisicoquímicas de la malla de mucinas⁹²), sí aletra todos los efectos de pLL observados sobre las BMDC⁶⁷. Por lo tanto, sólo aquellos tratamientos que afectan la estructura supra-molecular de las partículas impactan sobre los efectos de éstas sobre las BMDC⁶⁷. En

conjunto, los resultados previos, sumados a los mostrados en esta tesis utilizando pLL^{NP}, indican que los efectos inducidos por las partículas sobre las células, si bien no requieren de fagocitosis, dependen de una interacción íntima entre la membrana celular y la superficie de las partículas, lo que requiere, a su vez, del reordenamiento del citoesqueleto de actina y de la señalización a través de PI3K de clase I. Estas características de la interacción célula/partícula coinciden con un mecanismo propuesto por Yan Shi (2012)¹²⁹ al que se llamó MATS (del inglés, *membrane affinity triggered signalling*). Este autor propone que las células fagocíticas perciben estímulos del medio extracelular no sólo mediante interacciones receptor-ligando, sino además mediante el reconocimiento de las propiedades físicas de los materiales. En concreto, plantea que materiales particulados, como alúmina y urato de sodio, interaccionan mediante fuerzas electroestáticas con las cabezas polares de ciertos lípidos de la membrana plasmática de DC (entre ellos el colesterol y esfingolípidos), induciendo la agregación de balsas lipídicas en dicha membrana. Esto a su vez causa la agregación de proteínas con dominios ITAM, que transducen señales hacia el interior celular, con la participación de la quinasa Syk. La interacción célula-partícula necesaria para este tipo de señalización requiere de mecanismos moleculares semejantes a los utilizados por los eventos de fagocitosis convencional, que involucran a PI3K, y a la correcta dinámica del citoesqueleto de actina. Por lo tanto, este autor plantea que la membrana plasmática de las DC actuaría *per se* como un “receptor” de materiales sólidos, capaz de mediar la activación celular y en ciertos casos (pero no en otros) de desencadenar la fagocitosis de dichos materiales¹³⁰.

Uno de los efectos fenotípicos inducido por el urato de sodio sobre las DC es la potenciación de la expresión de CD86. En su trabajo, Ng G. y cols. (2008)¹³¹ observaron que la depleción de colesterol de la membrana celular eliminaba los efectos del urato de sodio sobre CD86, mientras que la proteólisis de los receptores de superficie celular no lo hacía. Por otro lado, el mismo conjunto de materiales particulados que se propone interaccionarían con las DC mediante MATS se sabe activan el inflammasoma NLRP3, induciendo el procesamiento de la pro IL-1 β ¹³². En este sentido, resultados del grupo muestran que la estimulación de BMDC con pLL+LPS induce fuertemente la secreción de IL-1 β en forma dependiente de NLRP3 (Casaravilla C., resultados no publicados). Por lo tanto, existen múltiples puntos de encuentro entre el modelo de activación de las DC planteado por Yan Shi y nuestros resultados usando partículas de LL. Sin

embargo, restan realizar más experimentos con nuestro modelo de condicionamiento celular, como por ejemplo evaluar el rol del colesterol de la membrana celular en los efectos de pLL sobre las BMDC e intentar explicar la aparente independencia de Syk de los efectos de pLL^{NP} en términos de cambios en CD86 y CD40 observada en la presente Tesis.

En suma, el mecanismo de condicionamiento de BMDC por partículas de la LL depende del contacto íntimo entre las células y las partículas, y posee similitudes con un mecanismo independiente de receptores convencionales propuesto para explicar el condicionamiento celular por materiales cristalinos, denominado MATS.

5.2. Análisis de la funcionalidad de BMDC estimuladas con pLL^{NP}

Para estudiar la funcionalidad de las BMDC estimuladas con pLL^{NP} en términos de su capacidad de estimular LT CD4⁺ e inducir así una respuesta inmune adaptativa, implementamos ensayos de MLR. Estos mostraron que los LT CD4⁺ co-cultivados con BMDC condicionadas con pLL^{NP} como único estímulo producen mayores niveles de IL-5, y que el condicionamiento de BMDC por pLL^{NP}, tanto en presencia como en ausencia de LPS, también induce en los LT CD4⁺ mayor producción de IL-17, en ambos casos en comparación con los LT CD4⁺ co-cultivados con BMDC control (Figura 4.1.4.1).

Las señales expresadas por las DC que inducirían la expresión de IL-5 por LT CD4⁺, y más en general, que inducen la diferenciación a T_H2, no se conocen bien. Con respecto a la inducción de LT productores de IL-17 en ratones, se sabe que se necesitan las citoquinas TGF- β , IL-6 e IL-1 β ^{133,134}, lo que sugiere que estas citoquinas están presentes en el co-cultivo de BMDC condicionadas con pLL^{NP} y LT CD4⁺. Si bien no hemos ensayado la producción de TGF- β por parte de las BMDC, sabemos que las BMDC estimuladas con pLL^{NP} únicamente, no secretan IL-6⁶⁷ ni IL-1 β (*Casaravilla C. resultados no publicados*), ni ninguna otra citoquina de las ensayadas⁶⁷. Los estímulos responsables de la secreción de citoquinas necesarias para la inducción de LT de tipo T_H17 en los co-cultivos en ausencia de LPS, podrían ser DAMPs provenientes células muertas por necrosis (generadas durante los 5 días de co-cultivo), o señales provistas por los LT CD4⁺ durante la sinapsis inmunológica (CD40L, por ejemplo¹³⁵). Como caso análogo, existen evidencias de que

DC condicionadas *in vitro* con alúmina deben ser estimuladas con LPS para producir IL-1 β , mientras que *in vivo* responden independientemente de dicha activación, probablemente debido a la generación de señales de peligro¹³⁶.

En co-estimulación con LPS, la presencia de pLL^{NP} potencia la capacidad de las BMDC de inducir LT CD4⁺ secretores de IL-17 pero no de IL-5. El segundo resultado no es sorprendente ya que se conoce que la estimulación de DC con LPS interfiere con la capacidad de estas células de inducir LT de tipo T_H2¹³⁷. Por su parte, la potenciación de la secreción de IL-17 podría deberse a la producción de IL-1 β por BMDC co-estimuladas con pLL^{NP}+LPS (*Casaravilla C., resultados no publicados*), en conjunto con la inducción de IL-6 por LPS, que no es afectada por pLL^{NP}⁶⁷. Así, si las BMDC estimuladas por pLL^{NP} en presencia de LPS produjeran TGF- β , serían células potencialmente inductoras de respuestas T_H17 *in vitro*. Con respecto al rol de TGF- β en la inducción de respuestas de tipo T_H2, la literatura indica que TGF- β inhibe dichas respuestas¹³⁸, por lo que la sola expresión de dicho factor no sería suficiente para explicar nuestros resultados en términos de IL-17 e IL-5 en conjunto.

Por su parte, como se discutió en la sección anterior, la PGE₂ podría ser producida por BMDC estimuladas con pLL^{NP}+LPS. Se conoce que la PGE₂ inhibe respuestas T_H1 y promueve respuestas T_H2, T_H17 y T_{reg}^{139,140}. Existen evidencias de que la PGE₂ condiciona a las DC para que induzcan respuestas de tipo T_H2 mediante la inducción de la expresión de OX40L (molécula crucial para el desencadenamiento de respuestas T_H2)¹⁴¹. En concordancia, la PGE₂ se asocia al desencadenamiento de enfermedades alérgicas como dermatitis atópica y asma¹⁴². Este marcado papel de la PGE₂ como inductor de respuestas T_H2 podría explicar la mayor secreción de IL-5 por parte de LT CD4⁺ co-cultivados con BMDC condicionadas por pLL^{NP}. Sin embargo, esta hipótesis no explicaría por qué no se observaron efectos robustos de pLL^{NP} sobre la producción otras citoquinas de tipo T_H2, como IL-13. Por otra parte, varios trabajos señalan a la PGE₂ como inductora de respuestas de tipo T_H17^{143,144,145,146,140}. *Khayrullina T. y cols. (2008)*¹¹⁹ demostraron que DC tratadas con PGE₂ exógena estimulan, mediante la secreción de IL-23, la producción de IL-17 por parte de LT CD4⁺ activados. *Tsuge K. y cols. (2019)*¹⁴⁷ plantean un modelo que explicaría la expansión de la población de LT_H17 causada por PGE₂ en sinergia con IL-23. Concretamente, la IL-23 producida por las DC promovería la secreción de PGE₂ por parte de los LT, dando como

resultado la expansión de LT_H17. Por lo tanto, si las BMDC estimuladas con pLL^{NP} (en presencia de señales de peligro) indujeran la secreción de PGE₂, dicho fenómeno podría explicar la presencia de LT productores de IL-17 en nuestro modelo experimental.

Por otro lado, como se mencionó en la sección 4.1.4, investigamos si el condicionamiento de BMDC por pLL^{NP} afectaba la inducción de LT_{reg} en presencia de IL-2 y TGF-β¹⁰⁷. Si bien el modelo de generación de LT_{reg} no fue reproducible en nuestras manos, en los casos en los que vimos inducción de LT_{reg} FoxP3⁺, el condicionamiento por pLL^{NP} no alteró el porcentaje de células que expresaban dicho factor de transcripción. De todos modos, para arribar a conclusiones sobre los efectos de partículas de LL sobre la capacidad de BMDC de inducir LT_{reg} es necesario definir condiciones reproducibles de inducción de LT FoxP3⁺ y realizar más estudios, incluyendo aquellos que sólo contemplan la posible producción endógena de TGF-β.

Finalmente, resta discutir el papel de las moléculas de superficie de DC estudiadas en este trabajo sobre la inducción de LT efectores. Como ya se ha mencionado, la expresión de CD86 es crucial para la inducción de LT efectores. Las BMDC estimuladas con partículas de la LL, tanto en ausencia como en presencia de LPS, presentan expresión aumentada de dicha molécula, lo que concuerda con la detección de citoquinas como IL-5 e IL-17 en dichas condiciones de co-cultivo. Por otro lado, en presencia de LPS, las BMDC estimuladas con pLL^{NP} expresan menores niveles de CD40 que aquellas estimuladas únicamente con LPS. Sin embargo, esta menor expresión de CD40 no se reflejó en menor inducción de LT CD4⁺ productores de citoquinas, ni se refleja en menor proliferación de LT⁵⁵. Para analizar esta aparente contradicción es importante señalar que desconocemos cómo puede cambiar la expresión de CD40 en respuesta a las señales provistas por los LT durante la sinapsis inmunológica.

En suma, nuestros ensayos de MLR evidenciaron que BMDC estimuladas con pLL^{NP} únicamente inducen en LT CD4⁺ secreción aumentada de IL-5 e IL-17, y que la producción de esta última citoquina también aumenta en la condición de co-estimulación con pLL^{NP}+LPS en comparación con estimulación con LPS solamente. Nuestros ensayos no arrojaron resultados claros con respecto a la producción de citoquinas de tipo T_H1 (IFN-γ) ni a la inducción de LT_{reg} FoxP3⁺ (aunque globalmente señalan que no se verían afectados). Por lo tanto, son necesarios

más estudios para tener un panorama global de la respuesta adaptativa desencadenada por LT CD4⁺ como resultado del condicionamiento de BMDC por partículas de la LL *in vitro*.

5.3. Análisis de la respuesta celular local en el modelo de infección secundaria con *E. granulosus* s.l.

En este trabajo observamos que ratones infectados intraperitonealmente con psc de *E. granulosus*, durante la etapa crónica de la infección, poseen un mayor número de células en CP que los ratones control (Figura 4.2.1.1). Si bien nuestro modelo no nos permite discernir si el aumento celular observado se debe al reconocimiento de las hidátides, a la necesidad de reparación tisular o (probablemente) a ambas, podemos decir que el hospedero reacciona a la infección aumentando el número de células presentes en el sitio de infección. En particular, aumenta tanto el número como la proporción de eosinófilos y macrófagos; también aumenta el número de LB (Figura 4.2.1.1, *resultados no mostrados de Cecilia Casaravilla*). El reclutamiento de eosinófilos es una característica típica de las infecciones por helmintos³⁴, así como lo es la aparición de macrófagos alternativamente activados⁶⁶. En concordancia con esto último la Dra. Cecilia Casaravilla ha observado expresión aumentada de marcadores de activación alternativa (Ym1 y Relm- α) en macrófagos provenientes de ratones infectados.

Las DC son fundamentales en la inducción de respuestas T_H2⁷¹. Sin embargo, qué fenotipos de las DC median dicha inducción es controversial¹⁴⁸. En este trabajo observamos aumento de la población de DC de CP en respuesta a la infección (si bien no en la de ganglio mesentérico), lo que sugiere un papel de este tipo celular en el sitio de infección durante la etapa crónica (Figura 4.2.2.3).

En términos fenotípicos, las DC de CP de ratones infectados mostraron una expresión levemente aumentada de CD40 y CD86 (Figuras 4.2.2.4 y 4.2.2.5), sin cambios en CD80 (Figura 4.2.2.6), y expresión pronunciada de PD-L1 y PD-L2 (Figuras 4.2.2.7 y 4.2.2.8). En tanto, las DC de ganglios mesentéricos no vieron alterado su patrón de expresión de las moléculas de superficie estudiadas, excepto por una leve disminución por debajo del nivel basal en la expresión de CD80

y PD-L1 (Figura 4.2.2.9). Ambos fenotipos difieren de los adquiridos por BMDC estimuladas con partículas de LL *in vitro*. Las diferencias entre modelos no son sorprendentes si se considera que éstos son profundamente distintos. En los estudios *in vitro*, en términos de estímulos de origen parasitario, sólo estimulamos con partículas de LL, lo que corresponde a una versión extremadamente simplificada de la interacción del parásito con las DC. Además, es concebible que *in vivo*, en el contexto de la infección, actúen agonistas de TLR endógenos (así como señales de contacto provenientes de otros tipos celulares). Por ejemplo, enfocándonos en la expresión de CD40, aún si las partículas de LL moderan la expresión de CD40 *in vivo*, el nivel de expresión de dicha molécula detectado en la infección podría reflejar su inducción por agonistas de TLR y su moderación por los efectos de materiales de la LL similares a pLL. Asimismo, las BMDC diferenciadas en presencia de GM-CSF son un modelo de DC “inflamatorias”¹⁴⁹ por lo que no se espera que necesariamente respondan en forma equivalente a las DC residentes de CP, que podrían constituir una parte de las DC detectadas en CP en nuestros experimentos (posiblemente junto con DC inflamatorias, como sugiere el aumento en el número total de DC observado). Las BMDC tampoco tienen por qué responder en forma similar a DC presentes en los ganglios mesentéricos, que incluyen DC residentes además de DC arribadas de los tejidos, y que además están sometidas a señales provenientes de la interacción con células T. Ejemplificando las diferencias en respuesta a pLL entre diferentes tipos de DCs, nuestros trabajos utilizando un modelo de DC esplénicas residentes¹⁴⁹ (BMDC diferenciadas *in vitro* en presencia de Flt3-L) mostraron que el condicionamiento con pLL no inhibe la expresión de CD40 y, en cambio, tiende a aumentarlo. En suma, los modelos de DC y estímulos utilizados *in vitro* generan resultados que no son fácilmente extrapolables a los obtenibles en nuestro modelo de infección, donde confluyen una gama más amplia de estímulos provenientes del parásito y señales provenientes de otras poblaciones celulares del hospedero. Cabe mencionar que uno de los objetivos de esta Tesis fue poner a punto un sistema de estimulación de BMDC con microhidátides de *E. granulosus* diferenciadas *in vitro*, concebido como un modelo “intermedio” entre los ensayos utilizando pLL y nuestro modelo de infección; lamentablemente, la generación de cultivos homogéneos de microhidátides no fue posible.

Nuestros resultados sobre el fenotipo de las DC concuerdan *grosso modo* con los reportados por *Pan W. y cols. (2013)*⁵¹. Dichos investigadores, aunque utilizando una definición de DC incompleta (únicamente células CD11c⁺), observaron que DC de bazo o sangre obtenidas luego de 6 meses post-infección con *E. granulosus* presentan mayor expresión de CD86 y MHC-II que las de ratones control. Los reportes del fenotipo adquirido por DC en infecciones crónicas por helmintos, si bien son escasos, describen fenotipos de activación “mínimos”, *i.e.* con leves aumentos en la expresión de algunas de las moléculas co-estimuladoras. Por ejemplo, *Mejri N. y cols. (2011)*¹⁵⁰ reportaron niveles de expresión de CD86, CD40 y CD80 basales en DC de CP a los 4 meses post-infección con *E. multilocularis*. Por su parte, un leve aumento en la expresión de CD40 en DC fue reportado por *Lundie R. y cols. (2017)*¹⁵¹ en un modelo de infección hepática con *S. mansoni*, inductor de respuestas fuertemente polarizadas a T_H2. En forma similar, *Straw A. D. y cols. (2003)*⁹⁰ observaron que DC provenientes de bazo de ratones infectados con *S. mansoni* presentan un leve aumento en la expresión de CD40 y CD80 acompañado de niveles basales de expresión de CD86, en comparación con niveles de expresión de estas moléculas mucho más altos observados en DC provenientes de ratones infectados con *T. gondii* (inductor de respuestas fuertemente polarizadas a T_H1). En la misma línea, *Smith K. A. y cols. (2011)*¹⁵², en un modelo infección con *H. polygyrus*, observaron un leve aumento de la expresión de CD40, en DC que además expresan bajos niveles de CD11c, en un modelo infección con *H. polygyrus*. Varios trabajos señalan a los niveles basales (o levemente aumentados) de CD40, y paradójicamente a la interacción de CD40 con su ligando CD154, como eventos clave para la inducción de respuestas T_H2²⁷.

En resumen, el patrón de moléculas co-estimuladoras expresadas por las DC en nuestro modelo de infección crónica con *E. granulosus*, en particular en la CP, es similar al encontrado en otros modelos de infección por helmintos en cuanto a la expresión generalmente débil y/o incompleta, en el sentido que aumenta para algunas de estas moléculas, pero no para otras. El hecho de que encontremos inducción de una respuesta de tipo T_H2 en nuestros ensayos de re-estimulación *ex vivo* (como se discute en la próxima sección) refuerza la hipótesis de que los niveles bajos de co-estimulación están vinculados a la inducción de respuestas de tipo T_H2.

Un aspecto de particular interés arrojado por el análisis de DC de CP de ratones infectados es la expresión aumentada de PD-L1 (también observada en macrófagos por la Dra. Cecilia Casaravilla) y PD-L2. Como ya se ha mencionado, PD-L1 y PD-L2 son moléculas reguladoras negativas, asociadas a la inducción de tolerancia inmunológica por parte de DC¹⁵³. Wang J. y cols (2018)¹⁵⁴, utilizando un modelo de infección con *E. multilocularis*, reportaron la importancia del eje PD-1/PD-L1 para el establecimiento crónico del parásito, sin identificar los tipos celulares que expresan PD-L1 en este sistema. A su vez, Terrazas L. I. y cols (2005)¹⁵⁵ y Smith P. y cols (2004)¹⁵⁶ observaron expresión aumentada de PD-L1 y PD-L2 en macrófagos provenientes de ratones infectados con *T. crassiceps* y *S. mansoni*, respectivamente. Así, la inducción de PD-L1 y PD-L2 en macrófagos locales en ratones infectados por helmintos parece ser un evento relativamente frecuente. Pero, ¿qué sucede con la expresión de dichas moléculas en DC? La y cols (2015)¹⁵⁷ reportaron mayor expresión de PD-L1 en DC del sitio de infección (hígado) de ratones infectados crónicamente con *E. multilocularis*, hallazgo que vincularon a la inducción de LT_{reg} (evidenciada a través de un aumento en los niveles de ARNm de Foxp3⁺ observado en este sistema). En la misma línea, nuestro trabajo muestra que tanto PD-L1 como PD-L2 son inducidas en DC provenientes de infección crónica con *E. granulosus*, aunque no encontramos un número aumentado de LT_{reg} FoxP3⁺ en la CP (o ganglio mesentérico) de los ratones infectados (Figuras 4.2.3.5 y 4.2.3.6). Por lo anterior, la posible regulación mediada por la expresión de PD-L1 y PD-L2 en DC en nuestro modelo experimental no implicaría la inducción de LT_{reg} FoxP3⁺, al menos en la etapa crónica de la infección.

La ausencia de detección en nuestro trabajo de un aumento en LT_{reg} FoxP3⁺ contrasta con observaciones anteriores realizadas en hidatidosis humana o en modelos de infección secundaria de ratones con *E. granulosus*. En hidatidosis humana, varios trabajos reportan la presencia de LT_{reg} FoxP3⁺ en los sitios de infección^{158,159} o circulantes¹⁶⁰. En infección experimental en ratón, Zhang Q. y cols (2015)¹⁶¹ observaron un aumento significativo en el porcentaje de LT CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ en ganglios linfáticos a los 3 meses de infección. En forma similar, Pan W. y cols (2013)⁵¹ observaron un aumento en el porcentaje de LT CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ en bazo y sangre periférica al mes, 6 y 12 meses post-infección. Asimismo, Mourglia G. y cols. (2011)¹⁰⁸ observaron aumento significativo del transcrito de FoxP3⁺ en CP en las etapas tempranas de la infección (3 días post

infección). Si bien los trabajos mencionados utilizan modelos muy similares al nuestro, se diferencian en la cepa de ratón utilizada (Balb/c en sus trabajos, C57BL/6 en el nuestro). En este sentido, el contexto genético de los ratones ha sido reportado como un factor determinante de las características de las respuestas inmunes desencadenadas por *E. granulosus*. Así, Mourglia G. y cols (2016)¹⁶² observaron que los ratones Balb/c son más susceptibles que los C57BL/6 a desarrollar equinocosis quística, lo que se asocia a respuestas celulares y humorales (locales y sistémicas) significativamente diferentes entre las cepas. Así, la CP de ratones C57BL/6 presenta mayor proporción de macrófagos y LB, mayor producción de NO y mayor proporción de anticuerpos naturales contra el parásito además de respuestas de anticuerpos más eficaces en comparación con ratones Balb/c. Fuera del contexto de la equinocosis, las diferencias entre la composición de LT en CP de ambas cepas de ratones fueron abordadas por Composto G. y cols. (2011)¹⁶³. Dichos investigadores observaron que las CP de ratones C57BL/6 presentan mayor proporción de LT CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo activado, pero que dichos LT no responden a la ligación con CD3, probablemente debido a que el consumo de arginina por parte de macrófagos, inducido por IFN- γ , promueve la supresión de la respuesta de LT. En cambio, las CP de ratones Balb/c se caracterizan por menores niveles de producción local de IFN- γ que en los ratones C57BL/6, lo que provoca que los macrófagos no supriman la activación de LT. Esto ejemplifica que, aunque no encontramos una proporción aumentada de LT FoxP3⁺ en ratones C57BL/6 infectados con *E. granulosus*, no se debe descartar la presencia de otros mecanismos supresores. Estos bien podrían incluir mecanismos supresores dependientes de PD-L1/PD-L2, pero independientes de la inducción de LT_{reg} FoxP3⁺.

En suma, en nuestro modelo no observamos expansión de LT CD4⁺ FoxP3⁺ en contraste con estudios anteriores, y esta diferencia probablemente se explique por diferencias genéticas entre las cepas de ratón utilizadas. En nuestro modelo sería importante estudiar la presencia de LT_{reg} FoxP3⁻ como son los LT Tr1, generados en respuesta a IL-10 y productores de esta citoquina¹⁶⁴.

5.4. Análisis de la producción de citoquinas en ganglios mesentéricos y bazo en el modelo de infección secundaria con *E. granulosus* s.l.

En esta Tesis también analizamos la respuesta adaptativa celular desencadenada frente a la infección crónica por *E. granulosus* mediante ensayos de re-estimulación *ex vivo* con LH (Figura 4.2.4.1). El LH es una mezcla antigénica capaz de desencadenar una respuesta inmune humoral durante la infección, lo que implica que al menos algunos de sus componentes son capaces de atravesar la pared de la hidátide e interactuar con los componentes del sistema inmune del hospedero. En este trabajo, mediante ensayos de re-estimulación de células de ganglio mesentérico y esplenocitos con LH evidenciamos la presencia de una respuesta inmune específica previa, generada *in vivo*. Además, obtuvimos información sobre la polarización de esta respuesta, a través de la medición, en los sobrenadantes de cultivo, de citoquinas características de los diferentes perfiles de LT.

Observamos que los ratones infectados desarrollan una respuesta adaptativa específica, que se evidencia por la producción, en respuesta a la re-estimulación con LH, de IL-5 e IL-13 por parte de los linfocitos del ganglio y bazo. Además, detectamos secreción de IFN- γ en respuesta a LH sólo por parte de las células de ganglio de ratones infectados. Estos resultados concuerdan con trabajos previos que describen a la respuesta inmune adaptativa desencadenada frente a la infección por *E. granulosus* como predominantemente de tipo T_H2 (caracterizada por la presencia de IL-5, IL-13 e IL-4) pero, además, con componentes de respuestas de tipo T_H1 (caracterizada por la presencia de IFN- γ), en ratones¹⁶⁵ así como en humanos (resumido en ⁵⁶). Con respecto a estudios de infección en ratón, *Mourglia G. y cols. (2011)*¹⁰⁸ observaron la inducción de citoquinas de tipo T_H1 (IFN- γ e IL-2) a los 5 días post-infección, seguida de secreción de citoquinas de tipo T_H2 una semana post-infección (IL-4, IL-5 e IL-13). Por su parte, *Dematteis S. y cols. (1999)*¹⁶⁶ reportaron que los niveles de IL-4 e IL-10 disminuyen al mes post-infección, lo que podría explicar nuestra imposibilidad de detectar IL-4 a los 6 meses post-infección. Por otra parte, no observamos diferencias significativas en la producción de IL-10 entre las muestras de ganglios mesentéricos de ratones control e infectados, lo que sugiere que no existen LT específicos para antígenos de LH productores de IL-10 en dichos ganglios. Por lo tanto, la producción de IL-10

observada en nuestros experimentos tendría lugar gracias a la estimulación *in situ* con LH de células innatas, como DC, macrófagos o MDSC. En la misma línea, la producción de IL-10 por parte de los esplenocitos mostró un fuerte componente innato, al que aparentemente se la superpuso secreción de IL-10 por parte de LT específicos para LH. La secreción de IL-10 en respuesta a la estimulación con LH, independientemente del origen celular de la citoquina, sugiere la existencia de mecanismos reguladores implementados por el parásito. En concordancia con esto, *Wang H. y cols. (2014)*¹⁶⁷ observaron que la infección con *E. granulosus* promueve la secreción de IL-10 en un modelo de inflamación de vías aéreas inducida por ovalbúmina. Finalmente, la respuesta de IL-17 de células de ganglios mesentéricos, sin llegar a la significancia estadística, sugirió re-estimulación específica de antígeno, en forma similar a la de IL-5, IL-13 e IFN- γ , revelando la complejidad de la respuesta inmune desencadenada frente a la infección. Al respecto, *Mezioug D. & Touil-Boukoffa C. (2012)*⁵⁴ detectaron mayores niveles de IL-17 en el suero y cultivo de PBMC estimulados con Ag5 de pacientes con equinococosis, en comparación con pacientes sanos. Dichos autores plantean que la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-17 en respuesta a la infección forma parte de un mecanismo anti-parasitario implementado por el hospedero. A su vez, en su trabajo, *Sutherland T. y cols. (2014)*¹⁶⁸ plantean que la inducción del marcador de activación alternativa Ym1 en macrófagos, en respuesta a infecciones parasitarias, podría contribuir a la inducción de la producción de IL-17 (vía IL-1 β) por parte de LT $\gamma\delta$, y el consecuente reclutamiento de neutrófilos. Como ya se mencionó, en nuestro modelo de infección se observa expresión aumentada de Ym1 en macrófagos peritoneales (resultados no publicados de C. Casaravilla). Esto abre la posibilidad de que la producción de IL-17 por parte de las células de los ganglios mesentéricos (en respuesta a la re-estimulación con LH) esté vinculada a la existencia de macrófagos con fenotipo alternativamente activado. En contraste con lo observado en células de ganglio, en las células de bazo sólo se observó una pequeña producción de IL-17, de probable origen innato, ya que no respondió a la re-estimulación con LH. Si bien la producción de IL-17 se asocia a LT efectores de tipo T_H17, también se han reportado ILC productoras de IL-17 (ILC17), que podrían explicar nuestro resultado^{169,170}. Además, como se mencionó antes, los LT $\gamma\delta$ también pueden producir IL-17 en respuesta a estímulos como IL-1 β ¹⁶⁸.

Finalmente, evaluamos posibles efectos del condicionamiento con pLL de las células de ganglio y bazo en términos de la producción de citoquinas en respuesta a la estimulación con LH. Observamos que en este contexto pLL no afecta la secreción de citoquinas, excepto en el caso de producción de IL-17 por esplenocitos. Allí se ve que el condicionamiento por pLL (sumado a la estimulación con LH) de esplenocitos provenientes de los ratones control potencia la secreción de IL-17. Como el efecto se ve tanto en células de ratones infectados como control, y el tiempo de co-cultivo (72 hs) no es suficiente para la inducción y proliferación de LT específicos de antígeno, la producción de IL-17 en este caso sería de origen innato. Por lo tanto, podría postularse que pLL condiciona a las APC para que promuevan la producción de IL-17 por parte de LT $\gamma\delta$ o ILC17 por mecanismos que desconocemos. Cabe recordar que nuestros ensayos de co-cultivo mostraron que el condicionamiento de BMDC por pLL promueve la secreción de IL-17 por parte de LT CD4⁺. Así, ambas aproximaciones experimentales, aunque claramente diferentes, sugieren que pLL puede condicionar células para que produzcan IL-17. Con respecto al vínculo entre la estimulación con partículas y la producción de IL-17, el nexo más claro parece ser la activación del inflammasoma. Así, es ampliamente conocido que la estimulación de células con materiales particulados, como alúmina o sílica, inducen la secreción de IL-1 β (vía el inflammasoma NLRP3), una de las citoquinas involucradas en la diferenciación de LT_H17¹⁷¹. Si bien en esta Tesis se realizaron experimentos preliminares para evaluar el efecto del inflammasoma NLRP3 en la producción de IL-17 en los ensayos de MLR, los resultados no fueron concluyentes. La bibliografía con respecto a la relación entre el condicionamiento de APC por partículas y la producción de IL-17 innata es nula. Por su parte, la potenciación por pLL de la producción de IL-17 por esplenocitos es menor en ratones infectados que en ratones control; en otras palabras, las células productoras de IL-17 provenientes de ratones infectados tendrían alterada su capacidad de producción de IL-17. Este resultado podría atribuirse a un mecanismo de evasión novedoso implementado por el parásito. En suma, es necesario realizar más experimentos para identificar la/las población/es de esplenocitos productores de IL-17 y su posible condicionamiento por partículas de la LL de *E. granulosus*.

En resumen, en esta sección de la Tesis observamos que la respuesta inmune adaptativa desencadenada frente a la infección secundaria de ratones con *E. granulosus* es compleja, y

posee componentes de las respuestas de tipo T_H2 , T_H1 y probablemente T_H17 en los ganglios que drenan el sitio de infección, mientras que, en bazo detectamos solo un componente de tipo T_H2 .

6. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo determinamos que el mecanismo de inducción del fenotipo semi-maduro en BMDC por partículas de la LL de *E. granulosus* posee componentes dependientes del contacto íntimo entre las partículas y las células, a nivel de célula individual, y componentes mediados por factores difusibles con efectos antiinflamatorios. Con respecto a la necesidad de contacto, sería interesante tratar a las BMDC con β -metilciclodextrina, de forma de remover el colesterol de la membrana celular, y evaluar así la relevancia del mecanismo de MATS en el condicionamiento de las células por las partículas. Con respecto a los factores difusibles, y considerando que uno de ellos podría ser TGF- β , sería interesante evaluar la posible producción de dicha citoquina por parte de las BMDC condicionadas por pLL. En la misma línea, resta evaluar los efectos de la inhibición de COX-2 o de la vía de señalización que involucra AMPc, de manera de investigar el posible papel de PGE₂, o del AMPc (respectivamente) en la inducción del fenotipo semi-maduro y/o de los efectos antiinflamatorios antes mencionados.

Aunque la literatura plantea que las BMDC con fenotipos semi-maduros serían tolerogénicas, en nuestros ensayos de MLR *in vitro* observamos que las BMDC condicionadas por partículas de la LL inducen la diferenciación de perfiles de LT efectores de tipo T_H2 y T_H17. Si bien las BMDC puestas a co-cultivar tienen el fenotipo semi-maduro, es importante estudiar si este fenotipo se altera debido a la sinapsis inmunológica, lo cual podría aportar pistas para explicar nuestros resultados. Por otra parte, en esta Tesis no llegamos a realizar ensayos de transferencia adoptiva de BMDC condicionadas *in vitro*; realizarlos sería de gran utilidad para tener un panorama global de la funcionalidad de las BMDC condicionadas por la LL.

Luego, observamos que *in vivo* en un modelo de infección secundaria con *E. granulosus*, las DC adquieren, en forma similar a otros modelos de infección por helmintos, un fenotipo de activación “mínimo”, que puede vincularse con la inducción de respuestas de tipo T_H2 modificadas. Además, en DC de CP en nuestro modelo, observamos una fuerte inducción de PD-L1/PD-L2. Queda como perspectiva estudiar las consecuencias inmunológicas de la expresión de PD-L1/PD-L2 en DC en la etapa crónica de la infección y los mecanismos asociados. Por último, no observamos en este modelo expansión de la población de LT_{reg} FoxP3⁺, lo que invita a

investigar la existencia de otras poblaciones de LT_{reg} (como ser LT productores de IL-10) capaces de mediar efectos inmunoreguladores en la etapa crónica de la infección por *E. granulosus*.

7. Bibliografía

1. Wen, H. *et al.* Echinococcosis: Advances in the 21st century. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, 1–39 (2019).
2. Torgerson, P. R., Carmona, C. & Bonifacino, R. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **94**, 703–713 (2000).
3. Gemmell, M.A. & Roberts, M. G. Modelling Echinococcus life-cycles. In: *Echinococcus* and Hydatid Disease (Thompson R. C. A. & Lymherry A. J. (Eds)). CAB International, U.K. 25 (7): 807-813 (1995)
4. Cucher, M. *et al.* *Echinococcus granulosus* pig strain (G7 genotype) protoscoleces did not develop secondary hydatid cysts in mice. *Vet. Parasitol.* **193**, 185–192 (2013).
5. Thompson R.C.A. *Echinococcus* and Hydatid Disease. CAB International, Wallingford, UK. 183–200 (1995).
6. Thompson, R. C. A. Biology and Systematics of *Echinococcus*. *Advances in Parasitology* **95**, (Elsevier Ltd, 2017).
7. Ceballos, L. *et al.* Comparative performances of flubendazole and albendazole in cystic echinococcosis: *Ex vivo* activity, plasma/cyst disposition, and efficacy in infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5861–5867 (2011).
8. Díaz, A. *et al.* Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: Structure. *Trends Parasitol.* **27**, 204–213 (2011).
9. Díaz, Sagasti, C. & Casaravilla, C. Granulomatous responses in larval taeniid infections. *Parasite Immunol.* **40**, 0–1 (2018).
10. Sakamoto, T. & Cabrera, P. A. Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle. *Acta Trop.* **85**, 271–279 (2003).
11. Bortoletti, G. & Ferretti, G. Ultrastructural aspects of fertile and sterile cysts of *Echinococcus granulosus* developed in hosts of different species. *Int. J. Parasitol.* **8**, 421–431 (1978).
12. Lascano, A. E. F. & Coltorti, E. A. Fine Structure of Membrane of the Germinal. **61**, 853–860 (2015).
13. Morseth, D. J. Fine Structure of the Hydatid Cyst and Protoscolex of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* **53**, 312 (1967).
14. Coltorti, E. A. & Varela-Díaz, V. M. *Echinococcus granulosus*: Penetration of macromolecules and their localization on the parasite membranes of cysts. *Exp. Parasitol.* **35**, 225–231 (1974).
15. Zhang, W., Wen, H., Li, J., Lin, R. & McManus, D. P. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: An update. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, (2012).
16. Rausch, R. & Schiller, E. L. Studies on the helminth fauna of Alaska. *Parasitology* **46**, 395–419 (1954).
17. Breijo, M., Anesetti, G., Martínez, L., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. *Echinococcus granulosus*: The establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation. *Exp. Parasitol.* **118**, 188–196 (2008).
18. Díaz, A., Casaravilla, C., Allen, J. E., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: Immunology. *Trends Parasitol.* **27**, 264–273 (2011).
19. Harris, A., Heath, D. D., Lawrence, S. B. & Shaw, R. J. *Echinococcus granulosus*: Ultrastructure of epithelial changes during the first 8 days of metacestode development in vitro. *Int. J. Parasitol.* **19**, 621–629 (1989).

20. Sakamoto T. & Sugimura, M. Studies on echinococcosis xxiii: electron microscopical observations on histogenesis of larval *Echinococcus multilocularis*. *18* (3): 131-144 (1970).
21. Gottstein B. & Hemphill, A. Immunopathology of echinococcosis. *Chem Immunol.* 66: 177-208. **1**, 2–7 (1997).
22. Richards, K. S., Arme, C. & Bridges, J. *Echinococcus Granulosus Equinus: An Ultrastructural Study of Murine Tissue Response to Hydatid Cysts.* *Parasitology* **86**, 407–417 (1983).
23. Barth, T. F. E. *et al.* Sensitive and Specific Immunohistochemical Diagnosis of Human Alveolar Echinococcosis with the Monoclonal Antibody Em2G11. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, 1–9 (2012).
24. Murphy K.T., & Walport M. *Inmunología de Janeway.* 7th ed, ed. M. G. (2009).
25. Mildner, A. & Jung, S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* **40**, 642–656 (2014).
26. Reis e Sousa C., 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology.* 6 (6): 476–483 (2006).
27. MacDonald, A. S., Straw, A. D., Dalton, N. M. & Pearce, E. J. Cutting Edge: T_H2 Response Induction by Dendritic Cells: A Role for CD40. *J. Immunol.* **168**, 537–540 (2002).
28. Lutz, M. B. How quantitative differences in dendritic cell maturation can direct T_H1/T_H2-cell polarization. *Oncoimmunology* **2**, 10–12 (2013).
29. Christofferson, G. & von Herrath, M. Regulatory Immune Mechanisms beyond Regulatory T Cells. *Trends Immunol.* **40**, 482–491 (2019).
30. Zhu, J. & Paul, W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* **20**, 4–12 (2010).
31. Knochelmann, H. M. *et al.* When worlds collide: T_H17 and T_{reg} cells in cancer and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 458–469 (2018).
32. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* **41**: 529–542 (2014).
33. Carbo, A. *et al.* Computational modeling of heterogeneity and function of CD4⁺ T cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **2**, 1–11 (2014).
34. Grecis, R. K. Immunity to Helminths: Resistance, Regulation, and Susceptibility to Gastrointestinal Nematodes. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 201–225 (2015).
35. Díaz, A. & Allen, J. E. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. *Eur. J. Immunol.* **37**, 3319–3326 (2007).
36. Fallon, P. G. & Mangan, N. E. Suppression of T_H2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 220–230 (2007).
37. Allen, J. E. & Maizels, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 375–388 (2011).
38. Nutman T. B., 2015. Looking beyond the induction of T_H2 responses to explain immunomodulation by helminths. *Parasite Immunology.* **37** (6): 304–313 (2015).
39. Bosurgi, L., Manfredi, A. A. & Rovere-Querini, P. Macrophages in injured skeletal muscle: A perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration. *Front. Immunol.* **2**, 1–10 (2011).
40. Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Stadecker, M. J. & Gause, W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 975–987 (2007).

41. Everts, B., Smits, H. H., Hokke, C. H. & Yazdanbakhsh, M. Helminths and dendritic cells: Sensing and regulating via pattern recognition receptors, T_H2 and Treg responses. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1525–1537 (2010).
42. van Riet, E., Hartgers, F. C. & Yazdanbakhsh, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology* **212**, 475–490 (2007).
43. Taylor, J. J., Mohrs, M. & Pearce, E. J. Regulatory T Cell Responses Develop in Parallel to Th Responses and Control the Magnitude and Phenotype of the Th Effector Populatio. *J. Immunol.* **176**, 5839–5847 (2006).
44. Finlay, C. M., Walsh, K. P. & Mills, K. H. G. Induction of regulatory cells by helminth parasites: Exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunol. Rev.* **259**, 206–230 (2014).
45. Van Ginderachter, J. A., Beschin, A., Baetselier, P. De & Raes, G. Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2976–2985 (2010).
46. Belkaid, Y., Blank, R. B. & Suffia, I. Natural regulatory T cells and parasites: A common quest for host homeostasis. *Immunol. Rev.* **212**, 287–300 (2006).
47. Khan, A. R. & Fallon, P. G. Helminth therapies: Translating the unknown unknowns to known knowns. *Int. J. Parasitol.* **43**, 293–299 (2013).
48. Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H. & Bach, J. F. The ‘hygiene hypothesis’ for autoimmune and allergic diseases: An update. *Clin. Exp. Immunol.* **160**, 1–9 (2010).
49. Smits, H. H. & Yazdanbakhsh, M. Chronic helminth infections modulate allergen-specific immune responses: Protection against development of allergic disorders? *Ann. Med.* **39**, 428–439 (2007).
50. Rogan, M. T. T-cell activity associated with secondary infections and implanted cysts of *Echinococcus granulosus* in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* **20**, 527–533 (1998).
51. Pan, W. *et al.* Surveillance on the Status of Immune Cells after *Echinococcus granulosus* Protoscoleces Infection in Balb/c Mice. *PLoS One* **8**, 4–11 (2013).
52. Zhang W., *et al.*, 2003. Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease. *Clinical microbiology reviews.* **16** (1): 18-36.
53. Tamarozzi, F., Mariconti, M., Neumayr, A. & Brunetti, E. The intermediate host immune response in cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* **38**, 170–181 (2016).
54. Mezioug, D. & Touil-Boukoffa, C. Interleukin-17A correlates with interleukin-6 production in human cystic echinococcosis: A possible involvement of IL-17A in immunoprotection against *Echinococcus granulosus* infection. *Eur. Cytokine Netw.* **23**, 112–119 (2012).
55. Seoane, P. I. *et al.* Particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer inhibit IL-4 and growth factor-driven Akt phosphorylation and proliferative responses in macrophages. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
56. Díaz, Á. Immunology of cystic echinococcosis (hydatid disease). *Br. Med. Bull.* **124**, 121–133 (2017).
57. Lightowers, M. W. Immunology and molecular biology of *Echinococcus* infections. *Int. J. Parasitol.* **20**, 471–478 (1990).
58. Wang, H. *et al.* *Echinococcus granulosus* infection reduces airway inflammation of mice likely through enhancing IL-10 and down-regulation of IL-5 and IL-17A. *Parasites and Vectors* **7**, 1–13 (2014).
59. Turhan, N. *et al.* Co-existence of *Echinococcus granulosus* infection and cancer metastasis in the liver correlates with reduced Th1 immune responses. *Parasite Immunol.* **37**, 16–22 (2015).
60. Daeki, A. O., Craig, P. S. & Shambesh, M. K. IgG-subclass antibody responses and the natural history of

- hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **94**, 319–328 (2000).
61. Barrios, A. A. *et al.* Inefficient and abortive classical complement pathway activation by the calcium inositol hexakisphosphate component of the *Echinococcus granulosus* laminated layer. *Immunobiology* 1–10 (2019). doi:10.1016/j.imbio.2019.05.009
 62. Ferreira A. M., *et al.*, 2000. How *Echinococcus granulosus* deal with complement. *Parasitology today.* **16** (4): 168–172 (2000).
 63. Irigoín, F., Ferreira, F., Fernández, C., Sim, R. B. & Díaz, A. myo-inositol hexakisphosphate is a major component of an extracellular structure in the parasitic cestode *Echinococcus granulosus*. *Biochem. J.* **362**, 297–304 (2002).
 64. Dempster, R. P., Berridge, M. V., Harrison, G. B. L. & Heath, D. D. *Echinococcus granulosus*: Development of an intermediate host mouse model for use in vaccination studies. *Int. J. Parasitol.* **21**, 549–554 (1991).
 65. Shepherd, J. C., Aitken, A. & McManus, D. P. A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **44**, 81–90 (1991).
 66. Amri, M. & Touil-Boukoffa, C. A protective effect of the laminated layer on *Echinococcus granulosus* survival dependent on upregulation of host arginase. *Acta Trop.* **149**, 186–194 (2015).
 67. Casaravilla, C. *et al.* Unconventional maturation of dendritic cells induced by particles from the laminated layer of larval *Echinococcus granulosus*. *Infect. Immun.* **82**, 3164–3176 (2014).
 68. Riganò, R. *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect. Immun.* **75**, 1667–1678 (2007).
 69. Steers, N. J. R., Rogan, M. T. & Heath, S. In-vitro susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production. *Parasite Immunol.* **23**, 411–417 (2001).
 70. Andrade, M. A. *et al.* *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages *in vitro*. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **10**, 150–155 (2004).
 71. Phythian-Adams, A. T. *et al.* CD11c depletion severely disrupts T_H2 induction and development *in vivo*. *J. Exp. Med.* **207**, 2089–2096 (2010).
 72. Maizels, R. M. *et al.* Helminth parasites - Masters of regulation. *Immunol. Rev.* **201**, 89–116 (2004).
 73. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (80-)*. **327**, 291–295 (2010).
 74. Steinfeldt, S. *et al.* The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for T_H2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *J. Exp. Med.* **206**, 1681–1690 (2009).
 75. Barton, G. M. & Medzhitov, R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 380–383 (2002).
 76. Carvalho, L. *et al.* Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function. *Immunology* **126**, 28–34 (2009).
 77. Cvetkovic, J., Ilic, N., Sofronic-Milosavljevic, L. & Gruden-Movsesijan, A. Glycans expressed on *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens are important for anti-inflammatory immune response polarization. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 355–367 (2014).

78. MacDonald, A. S. & Maizels, R. M. Alarming dendritic cells for Th2 induction. *J. Exp. Med.* **205**, 13–17 (2008).
79. Terrazas, C. A., Terrazas, L. I. & Gómez-García, L. Modulation of dendritic cell responses by parasites: A common strategy to survive. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, (2010).
80. Summan, A., Nejsum, P. & Williams, A. R. Modulation of human dendritic cell activity by Giardia and helminth antigens. *Parasite Immunol.* **40**, 0–2 (2018).
81. Dudek, A. M., Martin, S., Garg, A. D. & Agostinis, P. Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: Toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity. *Front. Immunol.* **4**, 1–14 (2013).
82. Martín-Fontecha, A. *et al.* Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: Impact on T lymphocyte traffic and priming. *J. Exp. Med.* **198**, 615–621 (2003).
83. Lutz, M. B. Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. *Front. Immunol.* **3**, 1–9 (2012).
84. Ilic, N. *et al.* Trichinella spiralis excretory-secretory products induce tolerogenic properties in human dendritic cells via toll-like receptors 2 and 4. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
85. MacDonald, A. S., Straw, A. D., Bauman, B. & Pearce, E. J. CD8 – Dendritic Cell Activation Status Plays an Integral Role in Influencing T_H2 Response Development. *J. Immunol.* **167**, 1982–1988 (2001).
86. Terrazas, C. A., Alcántara-Hernández, M., Bonifaz, L., Terrazas, L. I. & Satoskar, A. R. Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias T_H2 polarization in a cRAF dependent pathway. *FASEB J.* **27**, 4547–4560 (2013).
87. White, R. R. & Artavanis-Tsakonas, K. How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. *Virulence* **3**, 668–677 (2012).
88. Mejri, N., Müller, N., Hemphill, A. & Gottstein, B. Intraperitoneal *Echinococcus multilocularis* infection in mice modulates peritoneal CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cell development. *Parasitol. Int.* **60**, 45–53 (2011).
89. Lundie, R. J. *et al.* A central role for hepatic conventional dendritic cells in supporting T_H2 responses during helminth infection. *Immunol. Cell Biol.* **94**, 400–410 (2016).
90. Straw, A. D., MacDonald, A. S., Denkers, E. Y. & Pearce, E. J. CD154 Plays a Central Role in Regulating Dendritic Cell Activation During Infections That Induce T_H1 or T_H2 Responses. *J. Immunol.* **170**, 727–734 (2003).
91. Díaz, A., Casaravilla, C., Barrios, A. A. & Ferreira, A. M. Parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* **38**, 193–205 (2016).
92. Casaravilla, C. & Díaz, A. Studies on the structural mucins of the *Echinococcus granulosus* laminated layer. *Mol. Biochem. Parasitol.* **174**, 132–136 (2010).
93. Smyth, D. *In vitro* cultivation of Parasitic Helminths. Boca Raton, Florida: CRC Press (1990).
94. Rogan, M. T. & Richards, K. S. *In Vitro* Development Of Hydatid Cysts From Posterior Bladders And Ruptured Brood Capsules Of Equine *Echinococcus Granulosus*. *Parasitology* **92**, 379–390 (1986).
95. Hemer, S. *et al.* Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. *BMC Biol.* **12**, 1–22 (2014).
96. Zhang, W. B., Jones, M. K., Li, J. & McManus, D. P. *Echinococcus granulosus*: Pre-culture of protoscoleces *in vitro* significantly increases development and viability of secondary hydatid cysts in mice. *Exp. Parasitol.*

- 110, 88–90 (2005).
97. Lutz M. B., et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223** (1): 77–92 (1999).
 98. Rayasam, A. Isolating and culturing dendritic cells (Dendritic Cell J558 Protocol). *Protoc Exch* 22-24 (2015)
 99. Harlow, E. & Lane, D. Using antibodies: a laboratory manual. Woodbury, New York: *Cold Spring Harbor Press* (1998).
 100. Vanes, K. & Brandt P. Retardation of immunofluorescence during microscopy. *J Histochem Cytochem*, **33**:755-761 (1985).
 101. Conover, W. J. & Iman, R. L. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *Am. Stat.* **35**, 124–128 (1981).
 102. Grace-Martin, K. Why ANOVA and linear regression are the same analysis (www.theanalysisfactor.com/why-anova-and-linear-regression-are-the-same-analysis/)
 103. Harizi, H., Juzan, M., Pitard, V., Moreau, J.-F. & Gualde, N. Cyclooxygenase-2-Issued Prostaglandin E 2 Enhances the Production of Endogenous IL-10, Which Down-Regulates Dendritic Cell Functions . *J. Immunol.* **168**, 2255–2263 (2002).
 104. Pittini, Á. Tesis de Doctorado: Condicionamiento de células dendríticas por la capa laminar de *Echinococcus granulosus*: búsqueda de agonistas y mecanismos a nivel de señalización celular. PEDECIBA, UdelaR. Montevideo, Uruguay (2016).
 105. Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. kinetics of DC activation. *1*, 311–316 (2000).
 106. Kruisbeek, A. M., Shevach, E. & Thornton, A. M. Proliferative assays for T cell function. *Curret Prtocol in Immunology* (2004).
 107. Segura, M., Su, Z., Piccirillo, C. & Stevenson, M. M. Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: A potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1887–1904 (2007).
 108. Mourglia-Ettlin, G., Marqués, J. M., Chabalgoity, J. A. & Dematteis, S. Early peritoneal immune response during *Echinococcus granulosus* establishment displays a biphasic behavior. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, 1–11 (2011).
 109. Bhattacharyya, S. et al. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I κ B kinase activity. *Blood* **104**, 1100–1109 (2004).
 110. Worthington, J. J., Fenton, T. M., Czajkowska, B. I., Klementowicz, J. E. & Travis, M. A. Regulation of TGF β in the immune system: An emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology* **217**, 1259–1265 (2012).
 111. Hilkens, C. M. U., Isaacs, J. D. & Thomson, A. W. Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.* **29**, 156–183 (2010).
 112. Esebanmen, G. E. & Langridge, W. H. R. The role of TGF-beta signaling in dendritic cell tolerance. *Immunol. Res.* **65**, 987–994 (2017).
 113. Mou, H. bo, Lin, M. fang, Cen, H., Yu, J. & Meng, X. jian. TGF-beta1 treated murine dendritic cells are maturation resistant and down-regulate Toll-like receptor 4 expression. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **5**, 1239–1244 (2004).
 114. Mou, H. B., Lin, M. F., Huang, H. & Cai, Z. Transforming growth factor- β 1 modulates lipopolysaccharide-

- induced cytokine/chemokine production and inhibits nuclear factor- κ B, extracellular signal-regulated kinases and p38 activation in dendritic cells in mice. *Transplant. Proc.* **43**, 2049–2052 (2011).
115. Józefowski, S., Bobek, M. & Marcinkiewicz, J. Exogenous but not endogenous prostanoids regulate cytokine secretion from murine bone marrow dendritic cells: EP2, DP, and IP but not EP1, EP3, and FP prostanoid receptors are involved. *Int. Immunopharmacol.* **3**, 865–878 (2003).
 116. Harizi, H., Juzan, M., Grosset, C., Rashedi, M. & Gualde, N. Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE2 that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell. Immunol.* **209**, 19–28 (2001).
 117. Dauschies, A. & Joachim, A. Eicosanoids in parasites and parasitic infections. *Adv Parasitol.* **46**, 181-240 (2000).
 118. Kanan, J. H. C. & Chain, B. M. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *Immunology* **118**, 271–278 (2006).
 119. Khayrullina, T. et al. *In vitro* differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of T_H17 cells. *J Immunol.* 181(1), 721-35 (2008).
 120. Veerman, R. E., Güçlüler Akpınar, G., Eldh, M. & Gabrielsson, S. Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles – Functions and Therapeutic Applications. *Trends Mol. Med.* **25**, 382–394 (2019).
 121. Meldolesi, J. Extracellular vesicles, news about their role in immune cells: physiology, pathology and diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **196**, 318–327 (2019).
 122. Kim S. H., et al. Therapeutic effects of *Echinococcus granulosus* cystic fluid on allergic airway inflammation. *Experimental Parasitology.* 198, 63-70 (2019).
 123. Cai, Z., et al. Immunosuppressive exosomes from TGF- β 1 gene-modified dendritic cells attenuate T_H17-mediated inflammatory autoimmune disease by inducing regulatory T cells. *Cell Research.* 22, 607–610 (2012)
 124. Alessandrini, A. et al. Dendritic cell maturation occurs through the inhibition of GSK-3 β . *Cell. Immunol.* **270**, 114–125 (2011).
 125. Pittini Á, et al. Particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer inhibit CD40 upregulation in dendritic cells by interfering with Akt activation. *Infection and Immunity.* 87: 12 e00641-19 (2019).
 126. Harris, S. G. et al. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* **23**, 1–7 (2002).
 127. Hsu, T. L. et al. The surface carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* larva interact selectively with the rodent Kupffer cell receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* **192**, 55–59 (2013).
 128. Yang, C., et al. CLEC4F Is an Inducible C-Type Lectin in F4/80-Positive Cells and Is Involved in Alpha-Galactosylceramide Presentation in Liver. *PLoS One.* 6;8(6): e65070 (2013).
 129. Shi, Y. To forge a solid immune recognition. *Protein Cell* **3**, 564–570 (2012).
 130. Mu, L. et al. A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate redistribution-based sensing mechanism initiates a phagocytosis programming. *Nat. Commun.* **9**, 1–16 (2018).
 131. Ng, G. et al. Receptor-Independent, Direct Membrane Binding Leads to Cell-Surface Lipid Sorting and Syk Kinase Activation in Dendritic Cells. *Immunity* **29**, 807–818 (2008).
 132. Shu, F. & Shi, Y. Systematic overview of solid particles and their host responses. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
 133. Chung, Y. et al. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity* **30**,

- 576–587 (2009).
134. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
 135. Cella, M., et al. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* **184**(2):747-52 (1996).
 136. Khameneh, H. J. *et al.* The Syk–NFAT–IL-2 Pathway in Dendritic Cells Is Required for Optimal Sterile Immunity Elicited by Alum Adjuvants. *J. Immunol.* **198**, 196–204 (2017).
 137. McAleer J. P. & Vella A. T. Understanding How Lipopolysaccharide Impacts CD4 T-Cell Immunity. *Crit Rev Immunol.* **28**(4), 281-99 (2008).
 138. Sanjabi, S., Oh, S. A. & Li, M. O. Regulation of the immune response by TGF- β : From conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, 1–33 (2017).
 139. Kalinski, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E 2 . *J. Immunol.* **188**, 21–28 (2012).
 140. Sakata, D., Yao, C. & Narumiya, S. Prostaglandin E2, an immunoactivator. *J. Pharmacol. Sci.* **112**, 1–5 (2010).
 141. Kaiser, M. M. M. *et al.* Dectin-1/2–induced autocrine PGE 2 signaling licenses dendritic cells to prime Th2 responses. *PLoS Biol.* **16**, 1–28 (2018).
 142. Kapsenberg, M. L., Hilkens, C. M. U., Wierenga, E. A. & Kalinski, P. The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin. Exp. Allergy, Suppl.* **29**, 33–36 (1999).
 143. Boniface, K. *et al.* Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J. Exp. Med.* **206**, 535–548 (2009).
 144. Woolard, M. D., Hensley, L. L., Kawula, T. H. & Frelinger, J. A. Respiratory Francisella tularensis live vaccine strain infection induces Th17 cells and prostaglandin E2, which inhibits generation of gamma interferon-positive T cells. *Infect. Immun.* **76**, 2651–2659 (2008).
 145. Sheibanie, A. F., Tadmori, I., Jing, H., Vassiliou, E. & Ganea, D. Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells. *FASEB J.* **18**, 1318–1320 (2004).
 146. Nagasaka, S., Iwasaki, T., Okano, T. & Chiba, J. Antigen-specific IL-23/17 pathway activation by murine semi-mature DC-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**, 52–57 (2009).
 147. Tsuge, K., Inazumi, T., Shimamoto, A. & Sugimoto, Y. Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases. *Int. Immunol.* 1–10 (2019). doi:10.1093/intimm/dxz021
 148. Na, H., Cho, M. & Chung, Y. Regulation of Th2 cell immunity by dendritic cells. *Immune Netw.* **16**, 1–12 (2016).
 149. Xu, Y., Zhan, Y., Lew, A. M., Naik, S. H. & Kershaw, M. H. Differential Development of Murine Dendritic Cells by GM-CSF versus Flt3 Ligand Has Implications for Inflammation and Trafficking. *J. Immunol.* **179**, 7577–7584 (2007).
 150. Mejri, N., Müller, J. & Gottstein, B. Intraperitoneal murine Echinococcus multilocularis infection induces differentiation of TGF- β -expressing DCs that remain immature. *Parasite Immunol.* **33**, 471–482 (2011).
 151. Webb, L. M. *et al.* Type I interferon is required for T helper (Th) 2 induction by dendritic cells. *EMBO J.* **36**, 2404–2418 (2017).
 152. Smith, K. A. *et al.* Chronic Helminth Infection Promotes Immune Regulation In Vivo through Dominance of CD11c lo CD103 – Dendritic Cells . *J. Immunol.* **186**, 7098–7109 (2011).

153. Song, S. *et al.* Dendritic cells with an increased PD-L1 by TGF- β induce T cell anergy for the cytotoxicity of hepatocellular carcinoma cells. *Int. Immunopharmacol.* **20**, 117–123 (2014).
154. Wang, J. *et al.* Immunotherapy of alveolar echinococcosis via PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade in mice. *Parasite Immunol.* **40**, 1–10 (2018).
155. Terrazas, L. I., Montero, D., Terrazas, C. A., Reyes, J. L. & Rodríguez-Sosa, M. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* **35**, 1349–1358 (2005).
156. Smith, P. *et al.* Schistosoma mansoni Worms Induce Anergy of T Cells via Selective Up-Regulation of Programmed Death Ligand 1 on Macrophages. *J. Immunol.* **173**, 1240–1248 (2004).
157. La, X. *et al.* Upregulation of PD-1 on CD4⁺CD25⁺T cells is associated with immunosuppression in liver of mice infected with Echinococcus multilocularis. *Int. Immunopharmacol.* **26**, 357–366 (2015).
158. Jafari, R. *et al.* Immunohistochemical observation of local inflammatory cell infiltration in the host-tissue reaction site of human hydatid cysts. *J. Helminthol.* 1–9 (2018).
159. Vatankhah, A. *et al.* Characterization of the inflammatory cell infiltrate and expression of costimulatory molecules in chronic echinococcus granulosus infection of the human liver. *BMC Infect. Dis.* **15**, 1–12 (2015).
160. Tuxun, T. *et al.* Th17/Treg imbalance in patients with liver cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* **34**, 520–527 (2012).
161. Zhang, Q. *et al.* Role of immune tolerance in BALB/c mice with anaphylactic shock after *Echinococcus granulosus* infection. *Immunol. Res.* **64**, 233–241 (2016).
162. Mourglia-Ettlin, G., Cucher, M., Arbildi, P., Rosenzvit, M. & Dematteis, S. Natural and induced antibodies contribute to differential susceptibility to secondary cystic echinococcosis of Balb/c and C57Bl/6 mice. *Immunobiology* **221**, 103–115 (2016).
163. Composto, G. *et al.* Peritoneal T lymphocyte regulation by macrophages. *Immunobiology* **216**, 256–264 (2011).
164. Chihara, N., Madi, A., Karwacz, K., Awasthi, A. & Kuchroo, V. K. Differentiation and characterization of Tr1 cells. *Curr. Protoc. Immunol.* **2016**, 3.27.1-3.27.10 (2016).
165. Haralabidis, S., *et al.* Immunoglobulin and cytokine profile in murine secondary hydatidosis. *Parasite Immunol.* **17**, 625–630 (1995).
166. Dematteis, S. *et al.* Antibody and T_H1/T_H2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasite Immunol.* **21**, 19–26 (1999).
167. Ma, X. *et al.* Th17 cells are associated with the Th1/Th2-cell balance during echinococcus multilocularis infection. *Mol. Med. Rep.* **10**, 236–240 (2014).
168. Sutherland, T. E. *et al.* Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a tradeoff between nematode killing and host damage. *Nat. Immunol.* **15**, 1116–1125 (2014).
169. Hwang Y. & McKenzie A. Innate lymphoid cells in immunity and disease. *Adv Exp Med Biol.* **785**:9-26 (2013).
170. Takatori, H. *et al.* Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J. Exp. Med.* **206**, 35–41 (2009).
171. Deng, J., Yu, X. Q. & Wang, P. H. Inflammasome activation and T_H17 responses. *Mol. Immunol.* **107**, 142–164 (2019).

8. Anexo

8.1. Figuras suplementarias (células dendríticas)

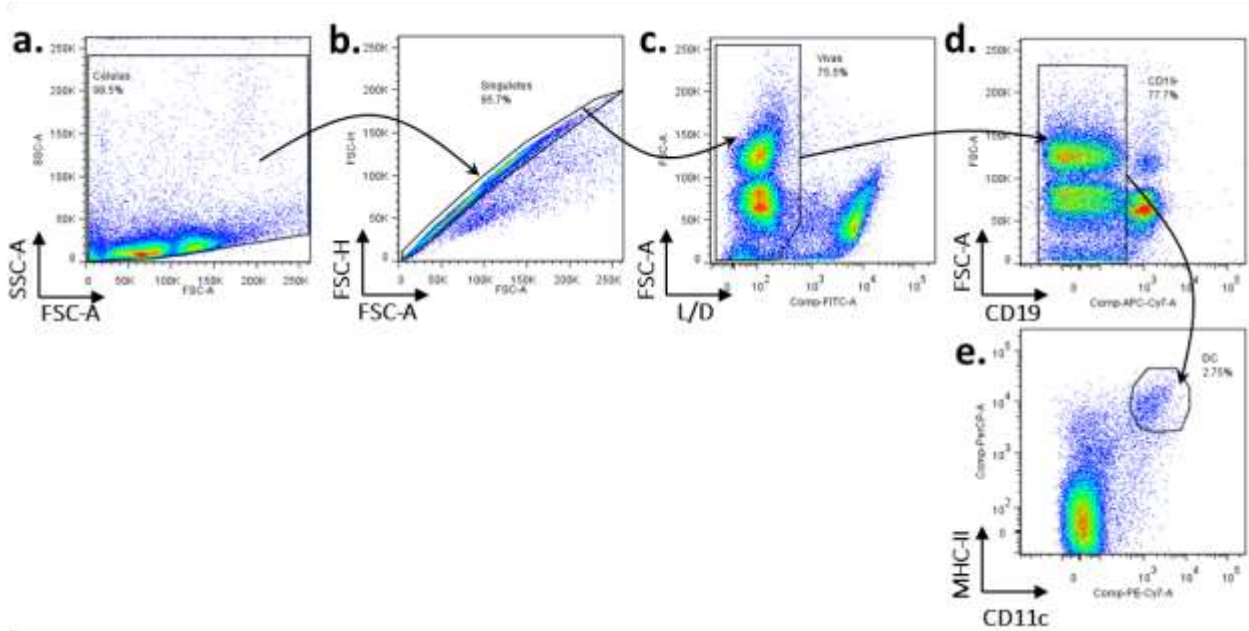


Figura 8.1.1. Estrategia de *gating* utilizada para definir DC de ganglio mesentérico en los ensayos de infección secundaria con *E. granulosus s. l.* Se muestra la estrategia de marcado y clasificación que se utilizó para definir las células dendríticas provenientes de ganglio mesentérico. En (a) se excluyen los restos celulares, en (b) se excluyen los dobletes, en (c) se excluyen las células muertas, en (d) se excluyen los linfocitos B y en (e) se definen las células dendríticas. En las tinciones en las que se marcó CD40, CD86 y PD-L2 no se incluyó el paso (c) por no contar con suficientes detectores de fluorescencia.

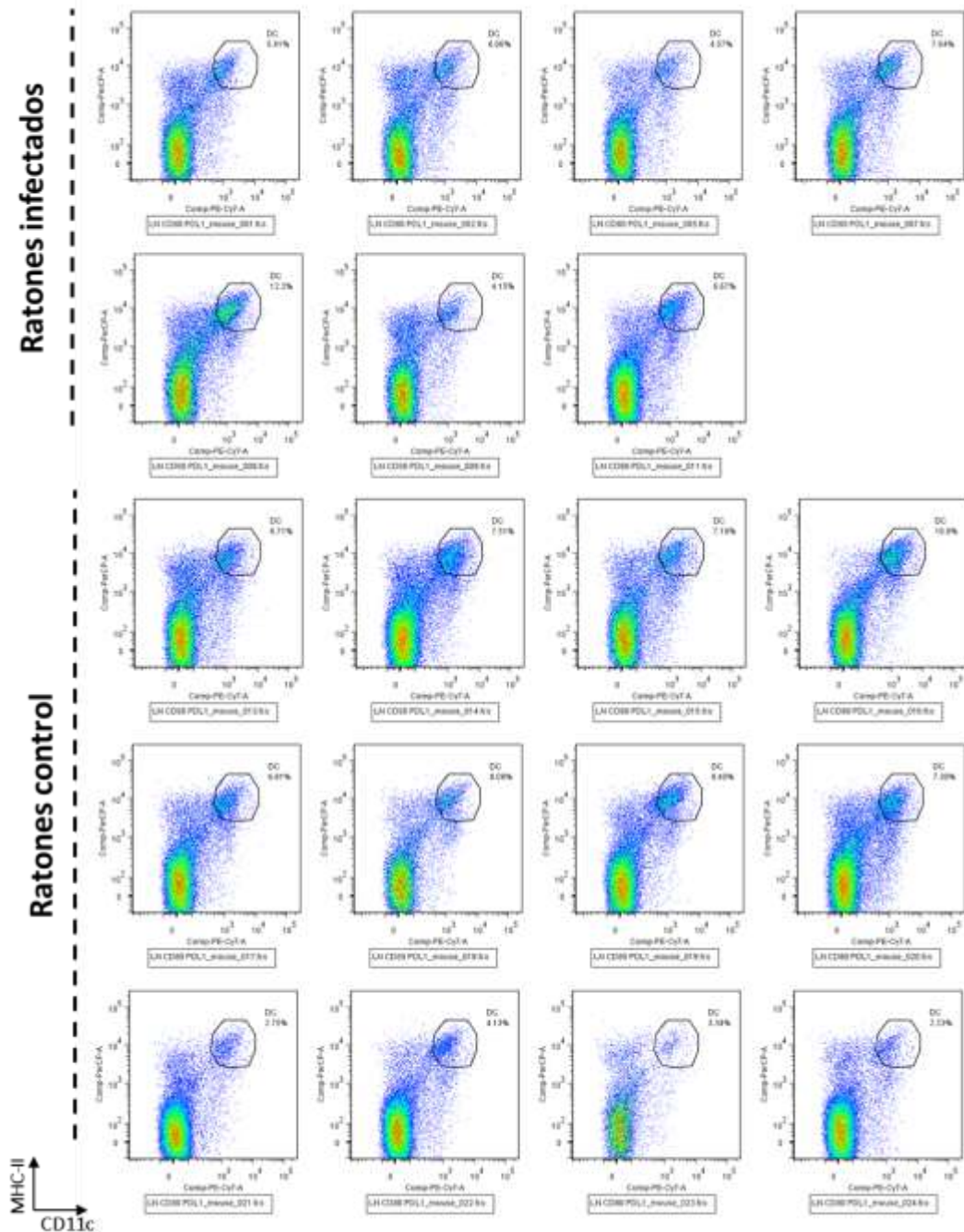


Figura 8.1.2. Definición de DC de ganglio mesentérico en los experimentos de infección secundaria con *E. granulosus* s. I. Los ratones infectados fueron inyectados con 2000 psc, vía ip., mientras que los controles fueron inyectados con PBS. Ambos grupos fueron sometidos a eutanasia 6 meses más tarde, durante la fase crónica de la infección. Los gráficos corresponden a un único experimento. Nota: Los números de ratones infectados no son consecutivos porque se excluyeron aquellos que no presentaron hidátides al momento de la eutanasia.

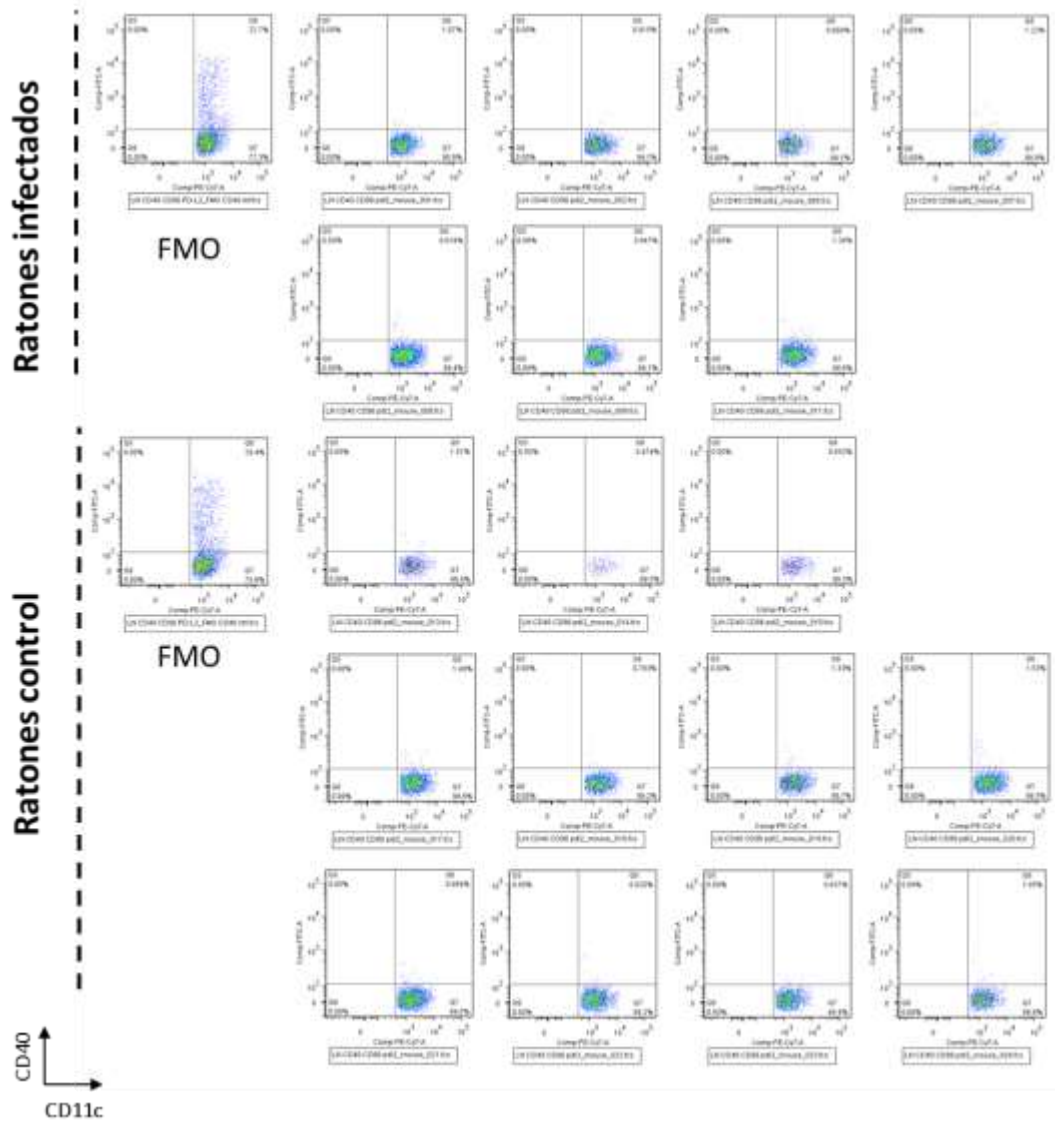


Figura 8.1.3. Expresión de la molécula co-estimuladora CD40 en DC de ganglios mesentéricos en un modelo de infección secundaria con *E. granulosus s. I*. Se muestra la expresión de CD40 en DC de ganglio mesentérico en forma de *dot plots*. Los gráficos corresponden a un único experimento.

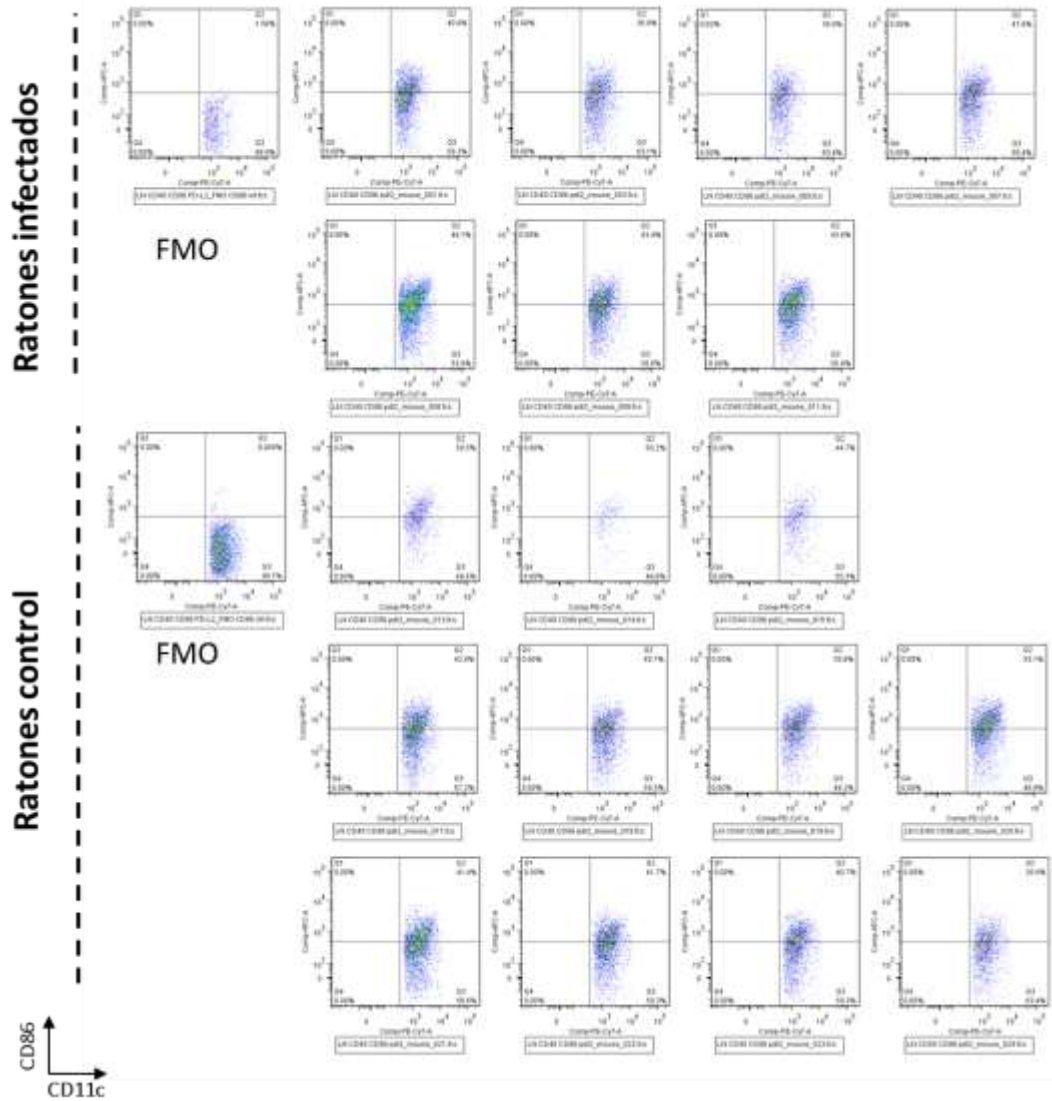


Figura 8.1.4. Expresión de la molécula co-estimuladora CD86 en DC de ganglios mesentéricos en un modelo de infección secundaria con *E. granulosus s. l.* Se muestra la expresión de CD86 en DC de ganglio mesentérico en forma de *dot plots*. Los gráficos corresponden a un único experimento.

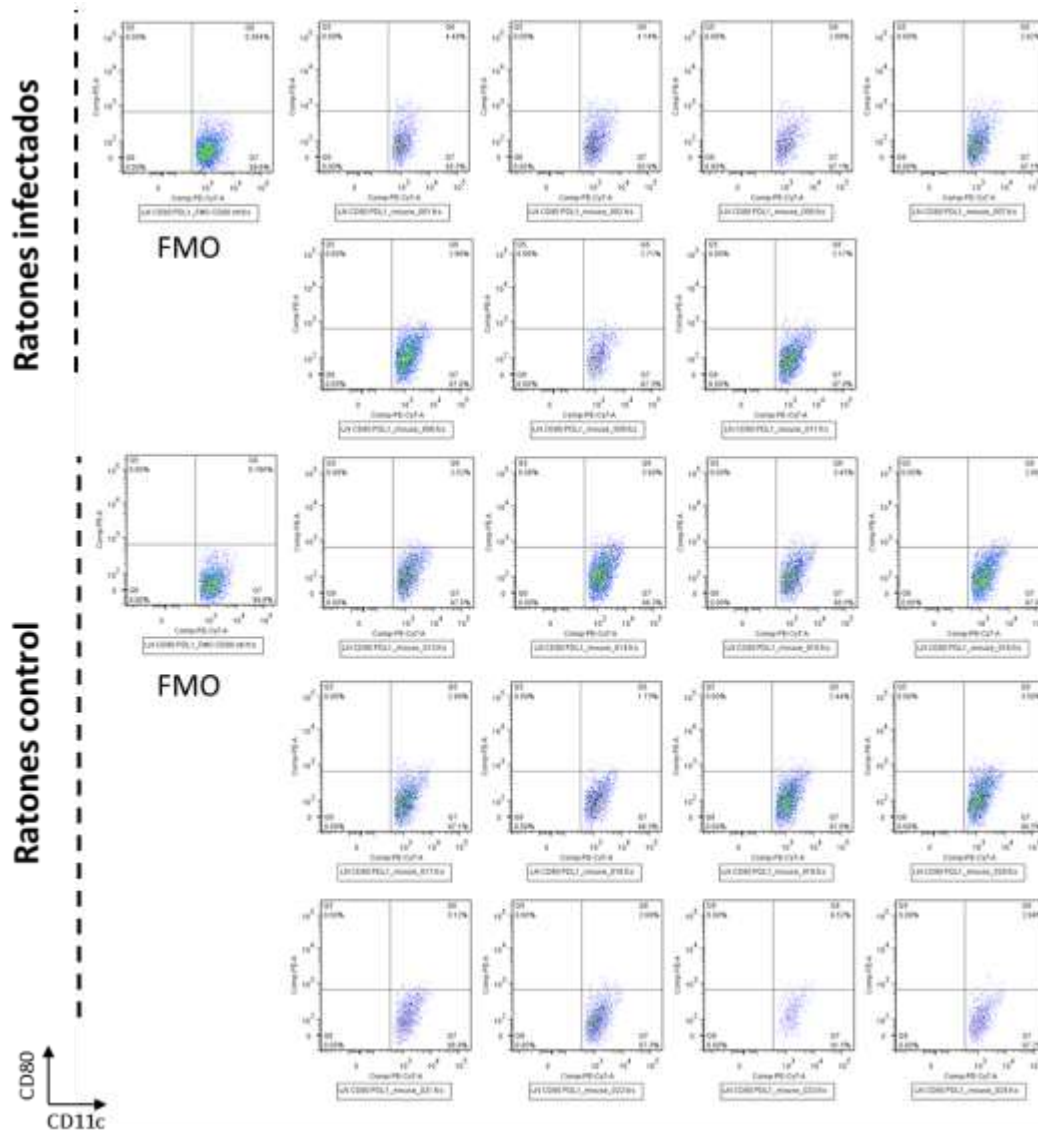


Figura 8.1.5. Expresión de la molécula co-estimuladora CD80 en DC de ganglios mesentéricos en un modelo de infección secundaria con *E. granulosus s. I*. Se muestra la expresión de CD80 en DC de ganglio mesentérico en forma de *dot plots*. Los gráficos corresponden a un único experimento.

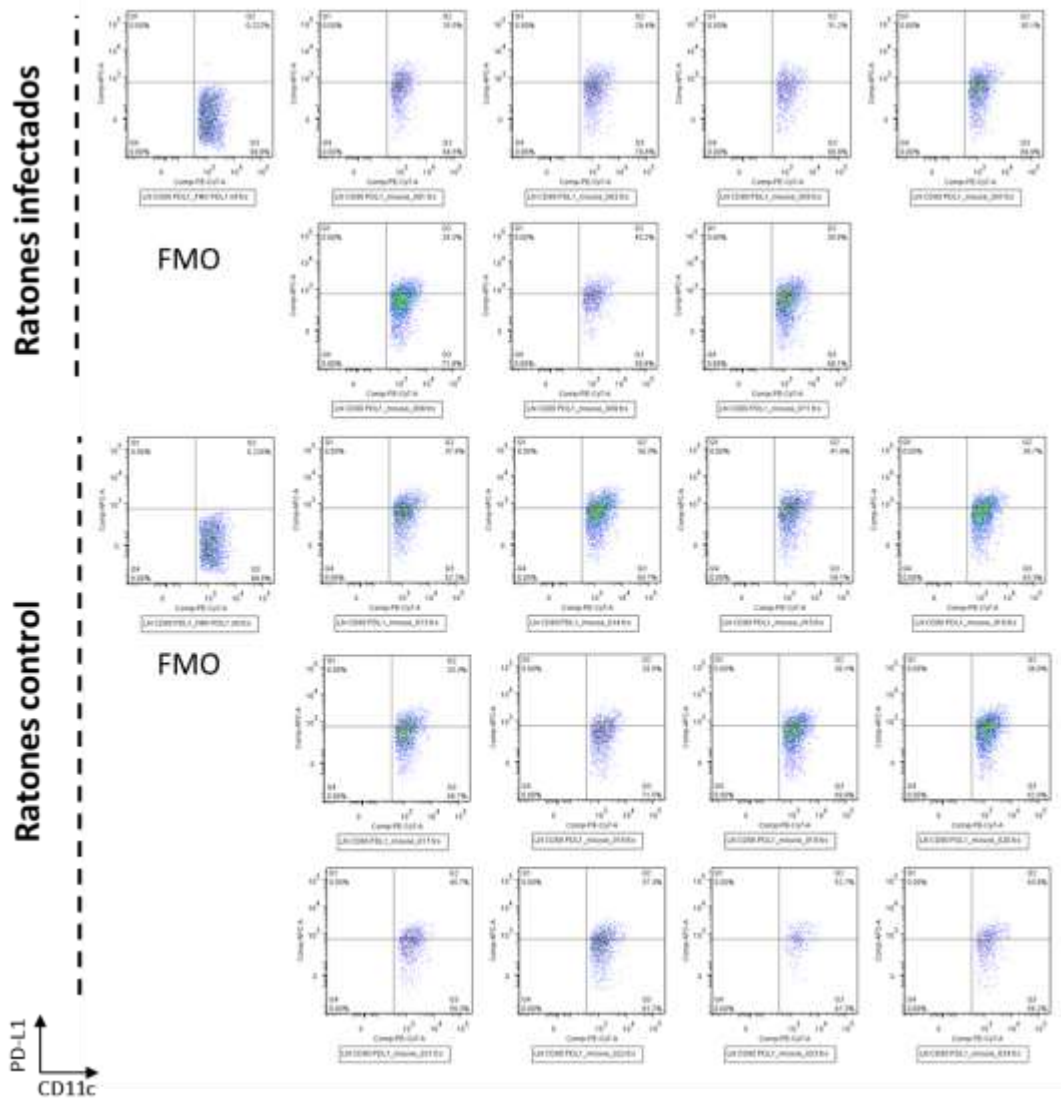


Figura 8.1.6. Expresión de la molécula co-inhibidora PD-L1 en DC de ganglios mesentéricos en un modelo de infección secundaria con *E. granulosus s. I*. Se muestra la expresión de PD-L1 en DC de ganglio mesentérico en forma de *dot plots*. Los gráficos corresponden a un único experimento.

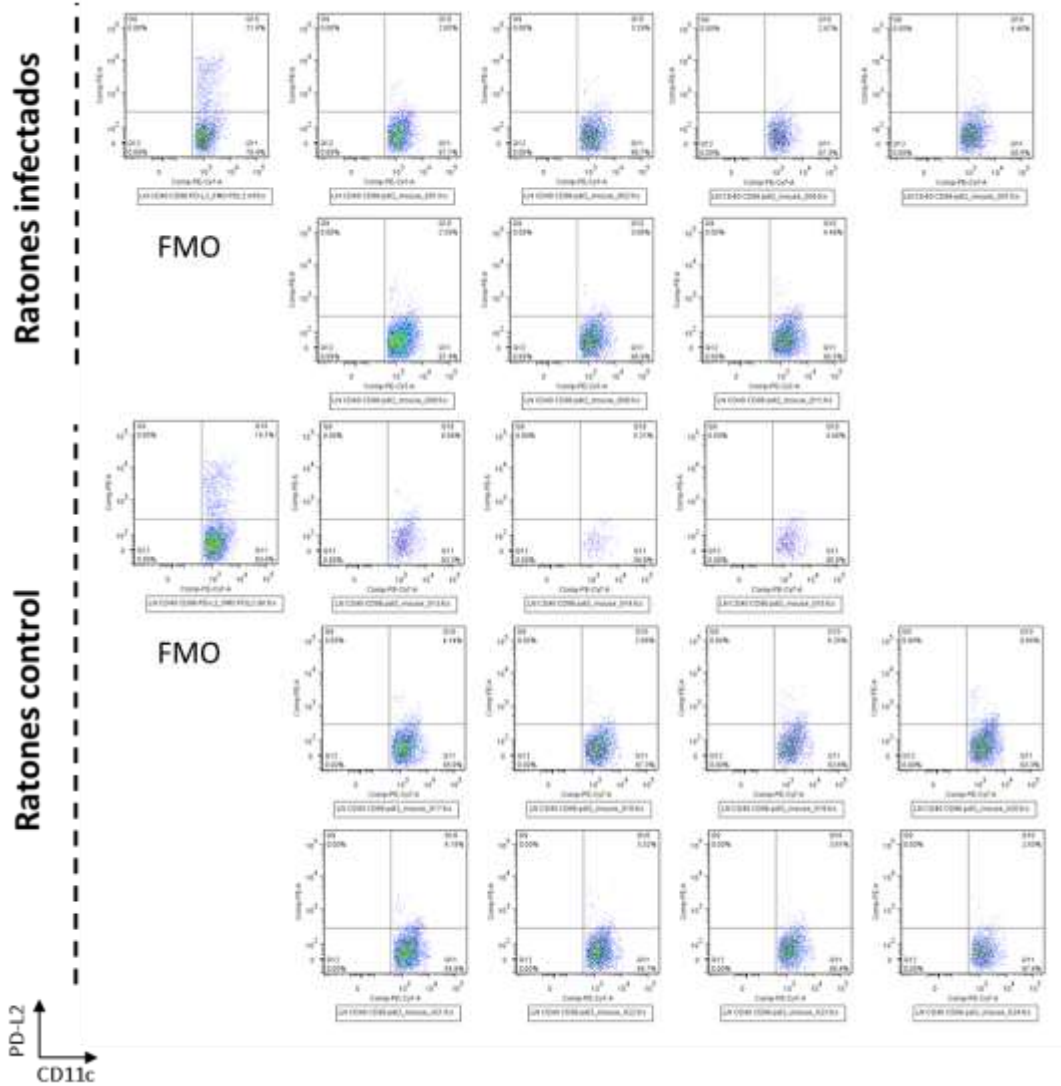


Figura 8.1.7. Expresión de la molécula co-inhibidora PD-L2 en DC de ganglios mesentéricos en un modelo de infección secundaria con *E. granulosus s. I.* Se muestra la expresión de PD-L2 en DC de ganglio mesentérico en forma de *dot plots*. Los gráficos corresponden a un único experimento.

8.2. Figuras suplementarias (linfocitos T)

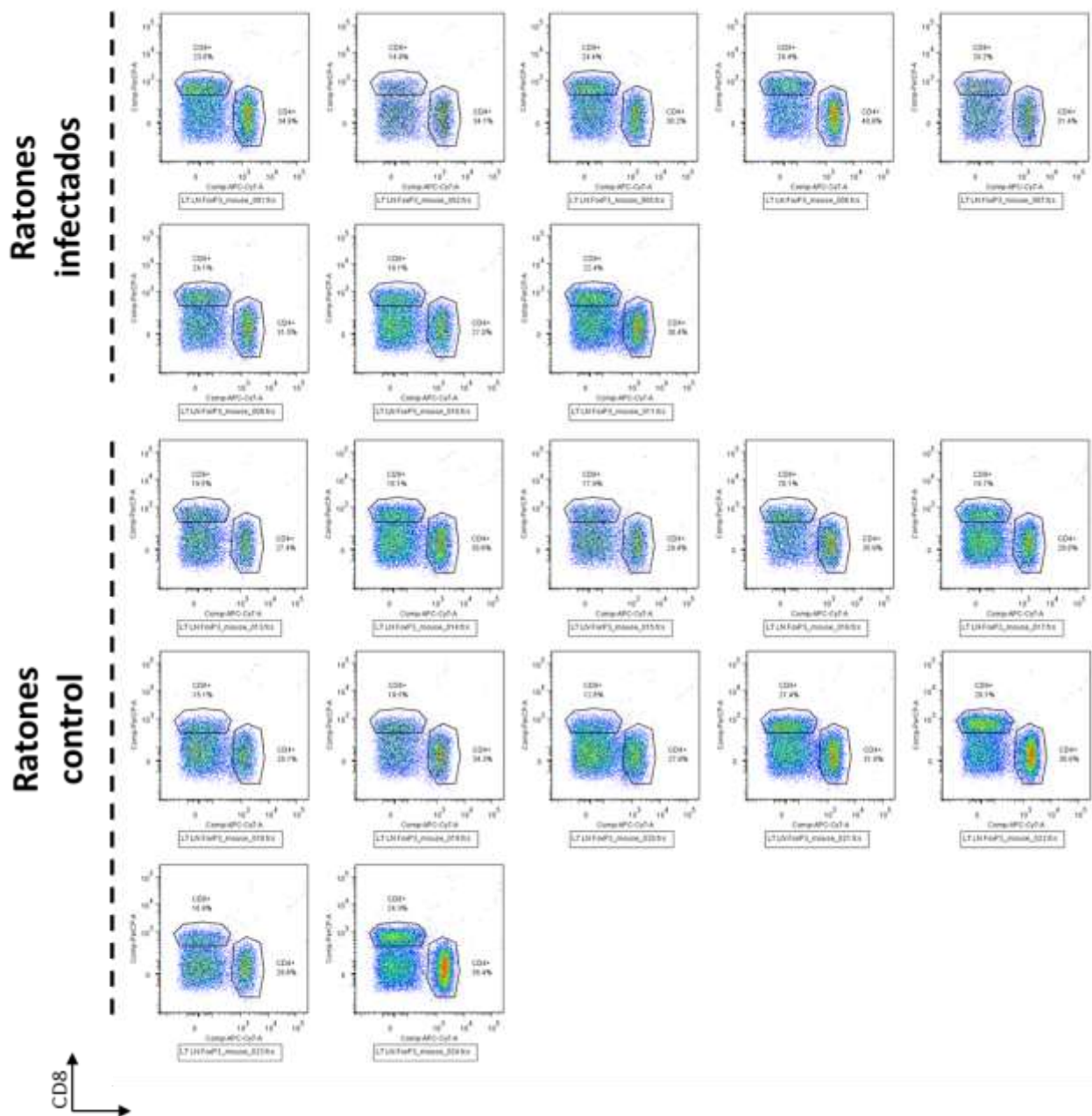


Figura 8.2.1. Definición de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de ganglios mesentéricos en los ensayos de infección secundaria con *E. granulosus* s. I. Los ratones infectados se inyectaron con 2000 psc, vía ip., mientras que los controles se inyectaron con PBS. Ambos grupos se sometieron a eutanasia 6 meses más tarde, durante la fase crónica de la infección y se obtuvieron los ganglios mesentéricos. Los gráficos corresponden a un único experimento.

Vale aclarar que la estrategia de *gating* utilizada para definir dichas poblaciones celulares es idéntica a la utilizada para definir las mismas poblaciones provenientes de CP (Figura 4.2.3.1).

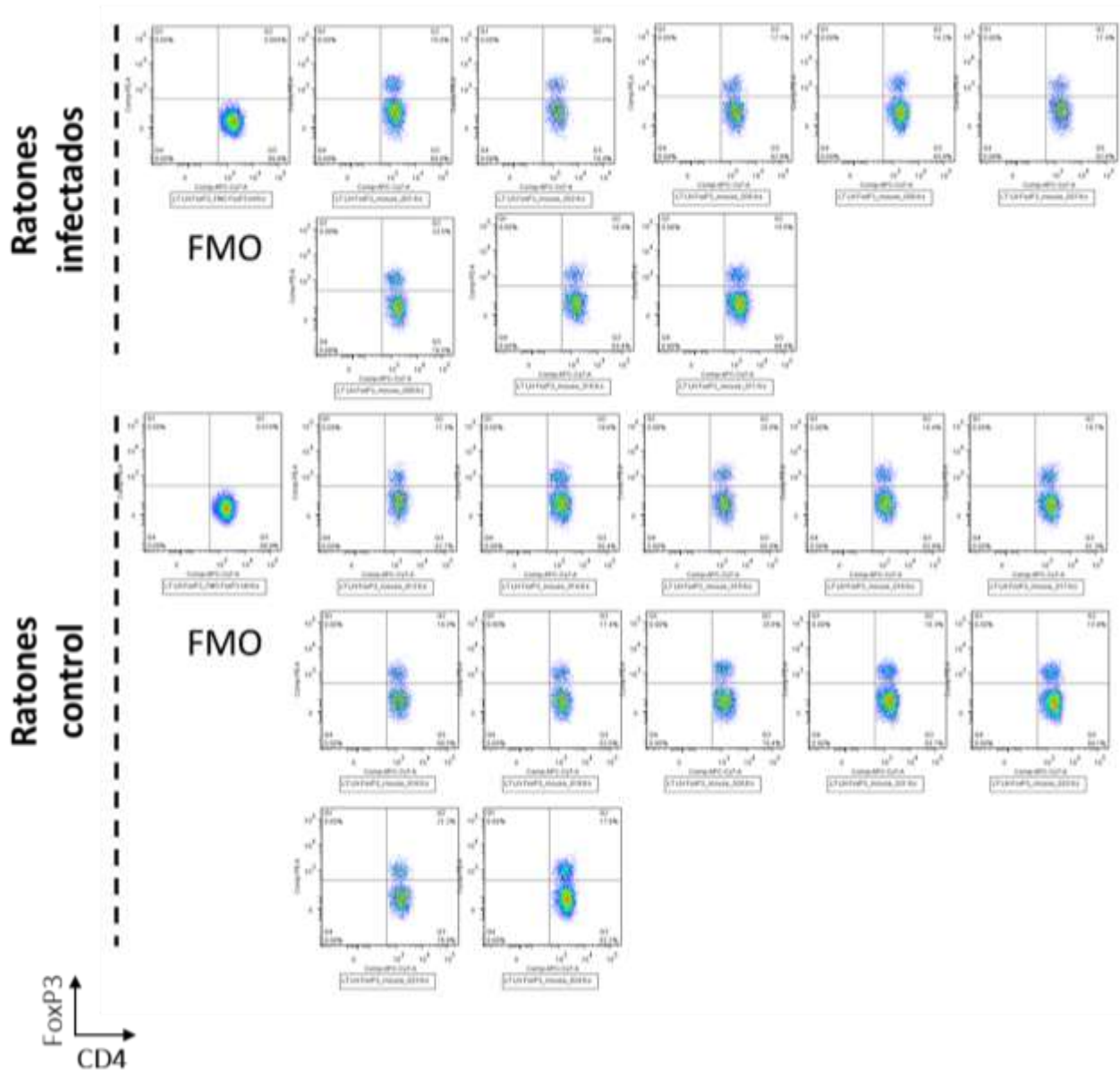


Figura 8.2.2. Expresión del factor de transcripción FoxP3 en LT CD4⁺ de ganglio mesentérico en los ensayos de infección secundaria con *E. granulosus* s. l. Se muestra la definición de LT CD4⁺ FoxP3⁺. Los cuadrantes se definieron utilizando los controles FMO mostrados para cada experimento.

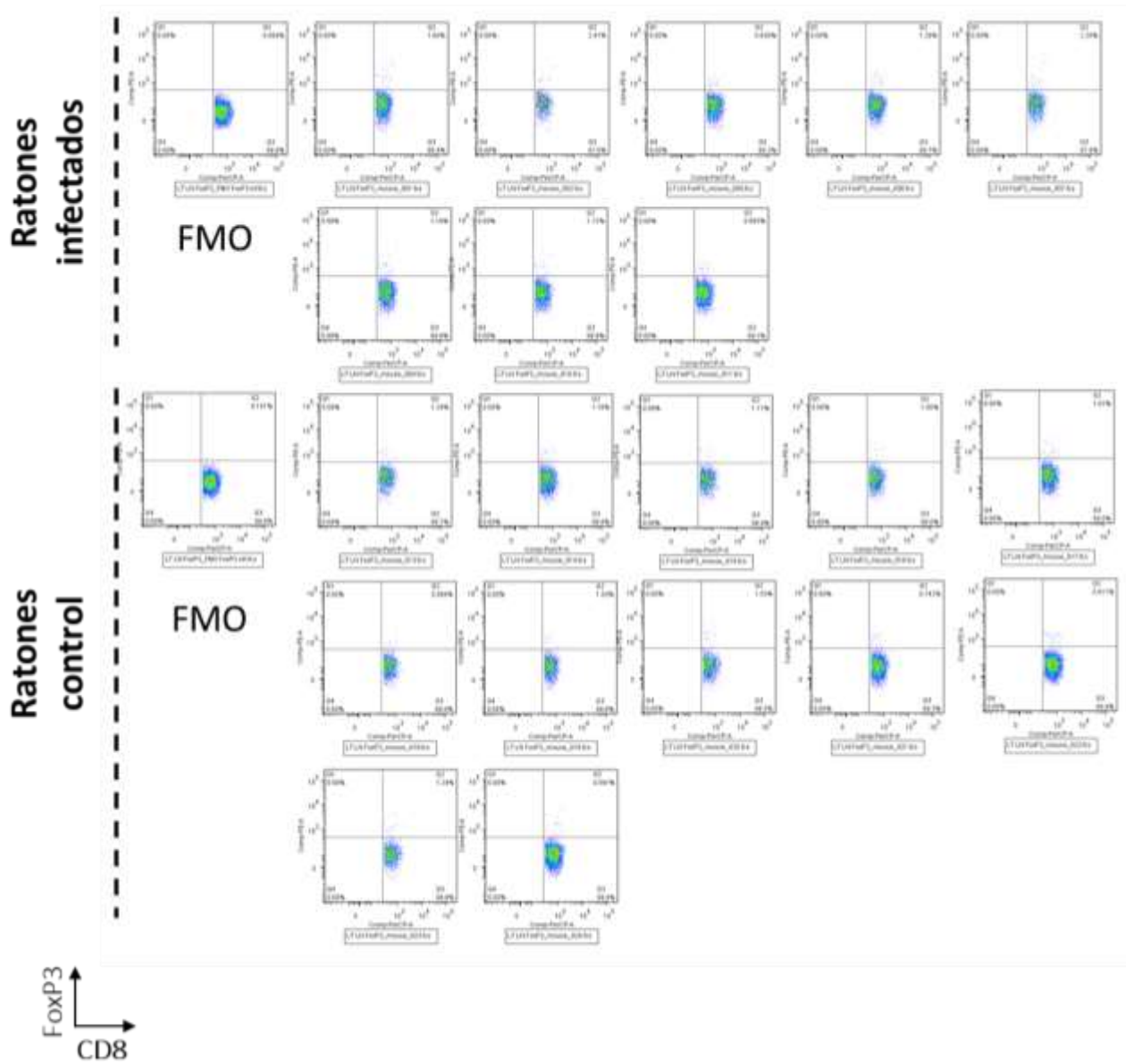


Figura 8.2.3. Expresión del factor de transcripción FoxP3 en LT CD8⁺ de ganglio mesentérico en los ensayos de infección secundaria con *E. granulosus* s. I. Se muestra la definición de LT CD8⁺ FoxP3⁺. Los cuadrantes se definieron utilizando los controles FMO mostrados para cada experimento.

8.2. Diferenciación de microhidátides de *E. granulosus* s. l. a partir del cultivo *in vitro* de protoescólices

Uno de los objetivos originales de este trabajo consistía en la obtención de diferentes materiales parasitarios, aptos para el trabajo con células, representativos de aquellos a los que se enfrenta el sistema inmune del hospedero durante una infección: desde microhidátides a partículas de LL de tamaño no fagocitable representativas de la superficie no fagocitable de la hidátide y/o de las eventuales partículas de LL liberadas al medio interno del hospedero como resultado del crecimiento de la hidátide. Por lo tanto, una parte de este trabajo se centró en la obtención de microhidátides *in vitro* a partir de la diferenciación de protoescólices. Se ensayaron al menos 3 protocolos diferentes reportados en la bibliografía (*Smyth D., 1990; Rogan M. T. & Richards K. S., 1986; Cucher M., et al., 2013; Hemer S., et al., 2014, Zhang W. B., et al., 2005*). Ninguna de las condiciones experimentales detalladas en la sección 3.2.8 (medio mono- y bifásico, protoescólices activados por pepsina y sin activar, adición de insulina al medio de cultivo, cultivo de vesículas prolíferas). En la Figura 4.1.2.1. se muestran como ejemplo las condiciones de diferenciación de los protoescólices en medio mono- y bifásico combinadas con el tratamiento con o sin pepsina. La figura muestra cómo en dichos ensayos una proporción de los parásitos lograron diferenciarse y formar vesículas, pero a diferencia de lo descrito en la bibliografía, en ningún caso se visualizó el desarrollo de la LL. Se muestra además que la mayoría de los protoescólices murieron luego de aproximadamente un mes en cultivo. Esto determinó que no fuera posible contar con estos materiales para estudios subsiguientes.

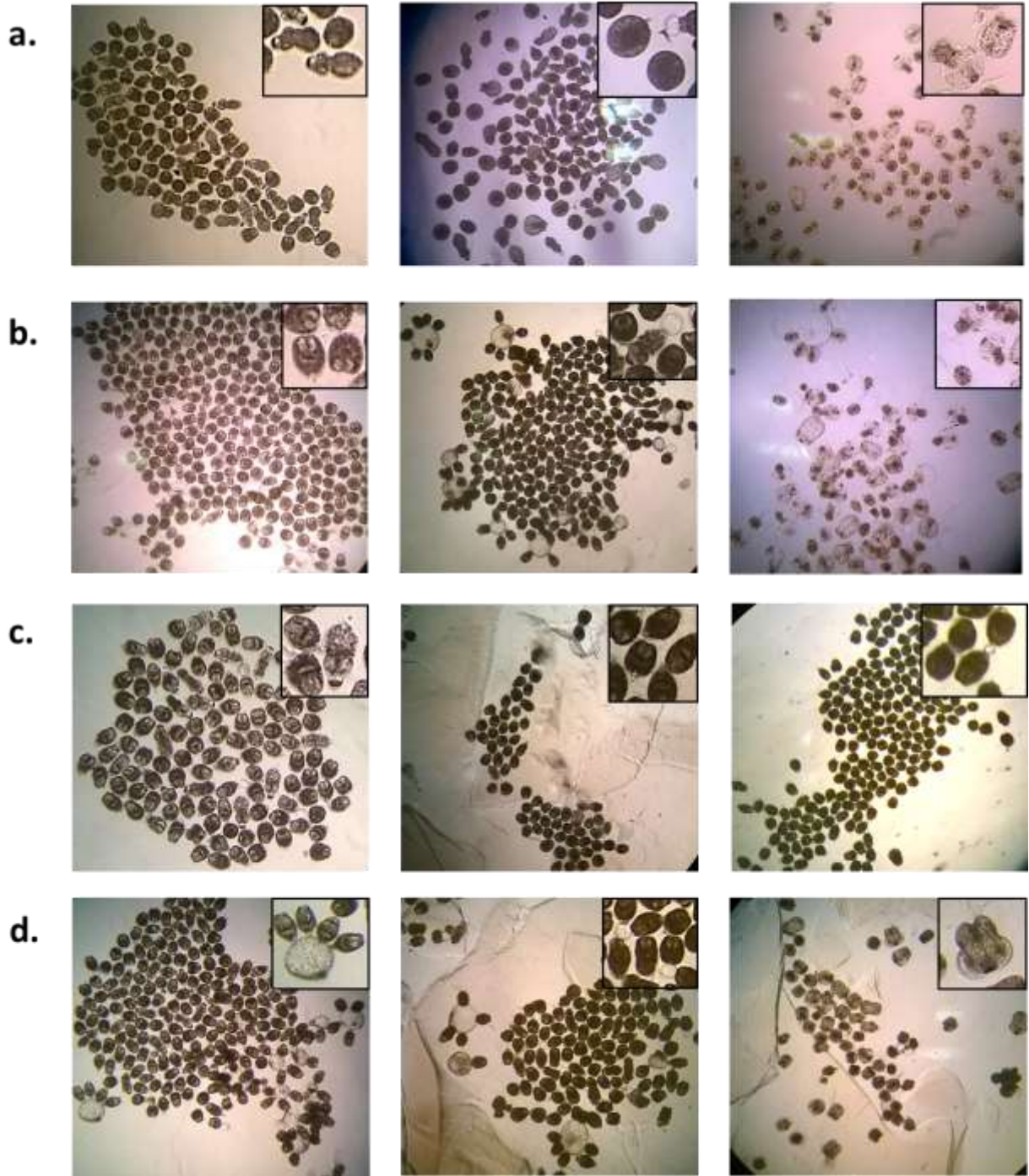


Figura 8.3.1. Ensayos de diferenciación de microhidátides de *E. granulosus s. l.* a partir del cultivo *in vitro* de protoscólices. Fotografías de microscopía de campo claro de protoscólex (psc) cultivados *in vitro* durante diferentes tiempos en las siguientes condiciones: (a) Psc activados cultivados en medio monofásico, (b) psc sin activar cultivados en medio monofásico, (c) psc activados cultivados en medio bifásico y (d) psc sin activar cultivados en medio bifásico. En cada fotografía (40X) se muestran amplificadas algunas de las morfologías observadas en cada condición de cultivo (100X).