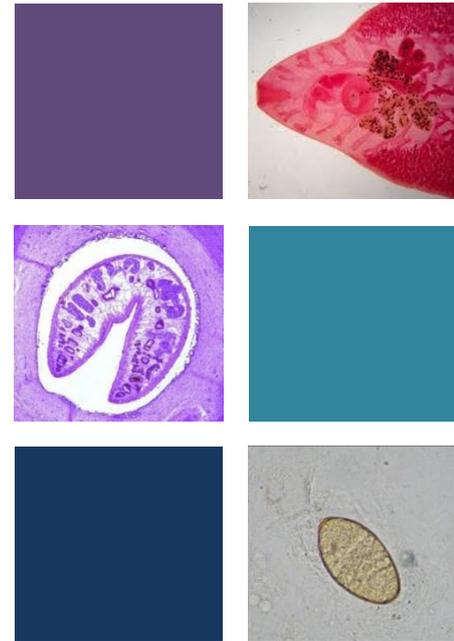


# Estudio de los componentes glucídicos de *Fasciola hepatica* y evaluación de su papel en la modulación de la respuesta inmune



**Tesis**

**Doctorado en Química**

**Lic. Juan Ernesto Rodríguez Camejo**

**Orientadoras:**

**Dra. Teresa Freire**

Dpto. Inmunobiología, Facultad de Medicina

**Dra. Cecilia Giacomini**

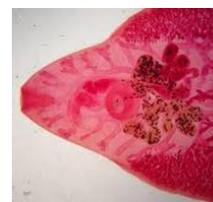
Área de Bioquímica, Facultad de Química



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

*"No tengo ningún talento en especial,  
sólo soy apasionadamente curioso"*  
*Albert Einstein*



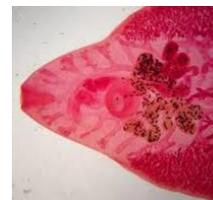


Índice.....	i
Índice de Figuras.....	v
Índice de Tablas.....	vii
Agradecimientos.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiii
<b>Capítulo I: Introducción.....</b>	<b>1</b>
<i>Fasciola hepatica</i> .....	3
Generalidades.....	3
Ciclo biológico.....	4
Control y tratamiento.....	6
<i>Sistema Inmunológico del hospedero definitivo</i> .....	6
Las células dendríticas: orquestadores esenciales para la activación de la respuesta inmune adaptativa.....	7
<i>Inmunomodulación por parásitos helmintos</i> .....	12
<i>Glicosilación</i> .....	14
Rol de los glicanos en la inmunomodulación inducida por parásitos helmintos.....	15
<i>Lectinas tipo C</i> .....	16
DC-SIGN.....	17
MGL.....	19
<i>Herramientas para el análisis glicobiológico</i> .....	21
Estrategias de inmovilización.....	22
Inmovilización covalente utilizando el método de ciano-4-dimetil-amino-piridinio tetrafluoro borato (CDAP-BF <sub>4</sub> ).....	24
Glicosidasas de interés glicobiológico.....	25
β-Galactosidasa.....	25
α-Manosidasa.....	26
<i>Hipótesis</i> .....	27
<i>Objetivo General</i> .....	27
<i>Objetivos Específicos</i> .....	27
<b>Capítulo II: Materiales y Métodos.....</b>	<b>29</b>
<i>Métodos generales</i> .....	31
Ratones.....	31
Preparación de los lisados de <i>Fasciola hepatica</i> .....	31
Oxidación de FhTE con meta-periodato de sodio.....	31

Cuantificación de Proteínas .....	32
Evaluación del reconocimiento de FhTE por Lectinas .....	32
Western Blot .....	34
PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) .....	34
Citometría de flujo .....	34
Análisis estadístico .....	36
<i>Modelo murino de Infección por F. hepatica</i> .....	36
Evaluación del daño hepático .....	36
Estudio de la respuesta inmune celular .....	36
Estudio de la respuesta inmune humoral.....	37
<i>Cultivo Celular</i> .....	37
Determinación de ligandos de TLR en FhTE .....	37
Células dendríticas .....	38
- Células dendríticas murinas .....	38
- Células dendríticas humanas .....	39
Ensayo de inducción de linfocitos T reguladores/anergia .....	39
Ensayo de polarización de linfocitos T vírgenes .....	39
Ensayos de internalización.....	40
Determinación de citoquinas .....	40
<i>Métodos utilizados en la inmovilización de glicosidasas</i> .....	41
Preparación del extracto enzimático de $\beta$ -Gal .....	41
Ensayo de actividad enzimática para la $\beta$ -Gal.....	41
Ensayo de actividad enzimática para la $\alpha$ -Manosidasa .....	42
Inmovilización de enzimas .....	43
- Activación de agarosa .....	43
- Activación de nanopartículas .....	43
- Inmovilización de la $\beta$ -Galactosidasa .....	44
- Inmovilización de la $\alpha$ -Manosidasa.....	44
- Cuantificación de proteínas de proteínas inmovilizadas.....	44
Deglicosilación de proteínas modelo .....	44
- Degalactosilación de asialofetaina .....	44
- Demanosidación de lactoferrina .....	45
Deglicosilación de FhTE con glicosidasas inmovilizadas .....	46
Análisis de azúcares .....	46
- Cromatografía en capa fina .....	46

- Cromatografía líquida de alta presión .....	46
<i>Determinación de la estructura de N-Glicanos</i> .....	46
Deglicosilación de proteínas utilizando PNGasa F .....	46
Purificación de oligosacáridos .....	47
Derivatización de oligosacáridos purificados .....	47
Separación y caracterización de N-Glicanos .....	47
<b>Capítulo III: Primeras evidencias del rol de los glicanos en la inmunomodulación por <i>Fasciola hepatica</i></b> .....	<b>49</b>
<i>Introducción</i> .....	51
<i>Resultados</i> .....	52
<i>Fasciola hepatica</i> induce una respuesta inmune de tipo Th2 modificada .....	52
Glicanos presentes en <i>F. hepatica</i> portan diversos motivos carbohidratos .....	55
Los carbohidratos de <i>F. hepatica</i> participan en la producción de IL-4 e IL-10, y en la disminución de IFN $\gamma$ .....	57
<i>F. hepatica</i> modula las células dendríticas in vivo .....	59
Glicoconjugados de <i>F. hepatica</i> modulan la función estimuladora de células dendríticas .....	62
Los componentes de <i>F. hepatica</i> interactúan y son internalizados por células dendríticas a través de CLRs específicos de Manosa .....	65
<i>F. hepatica</i> modula la maduración de células dendríticas a través de un incremento de IL-10 y una disminución de IL-12/23p40 .....	66
<i>Discusión</i> .....	70
<b>Capítulo IV: Inmovilización de glicosidasas para la generación de herramientas para el estudio del rol biológico de los glicanos.</b> .....	<b>73</b>
<i>Introducción</i> .....	75
<i>Resultados</i> .....	75
Inmovilización de Glicosidasas .....	75
Deglicosilación de proteínas modelo .....	77
- Degalactosilación de asialofetuina .....	79
- Demanosilación de Lactoferrina .....	80
Deglicosilación de FhTE .....	84
<i>Discusión</i> .....	86
<b>Capítulo V: <i>Fasciola hepatica</i> modula células dendríticas a través de DC-SIGN</b> .....	<b>91</b>
<i>Introducción</i> .....	93
<i>Resultados</i> .....	94
DC-SIGN internaliza glicoconjugados de <i>F. hepatica</i> y media un aumento en la producción de IL-10 e IL-27p28 por células dendríticas humanas estimuladas por ligandos de TLR ....	94
DC-SIGN interactúa con estructuras glucídicas de FhTE que presentan manosa y fucosa ..	98

Glicocojugados de <i>F. hepatica</i> inducen células dendríticas regulatorias a través de DC-SIGN.....	100
La inhibición de IL-12/23p40 en BMDCs es mediada por CD209a, pero no así la producción de IL-10 ni su capacidad estimuladora de linfocitos T .....	102
<i>Discusión</i> .....	104
<b>Capítulo VI: Rol de MGL en la inmunomodulación de células dendríticas inducida por <i>F. hepatica</i> .....</b>	<b>109</b>
<i>Introducción</i> .....	111
<i>Resultados</i> .....	112
Los glicoconjugados de <i>F. hepatica</i> potencian la producción de TNF $\alpha$ e IL-10 por ligandos de TLR vía hMGL .....	112
Los antígenos de <i>F. hepatica</i> inducen polarización Th2 mediante la reducción de IFN $\gamma$ a través de su interacción con hMGL .....	113
hMGL interactúa con el antígeno Tn presente en FhTE .....	115
Células mMGL2 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> son reclutadas al peritoneo de ratones infectados con <i>F. hepatica</i> .....	117
Las células mMGL2 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> de ratones infectados con <i>F. hepatica</i> expresan IL-10, TNF $\alpha$ y TGF $\beta$ y modulan la producción de citoquinas por linfocitos T CD4 <sup>+</sup> alogénicos .....	120
<i>Discusión</i> .....	124
<b>Capítulo VII: Discusión General y Conclusiones.....</b>	<b>129</b>
<i>Discusión General</i> .....	131
<i>Conclusiones</i> .....	137
<b>Capítulo VIII: Bibliografía.....</b>	<b>138</b>



## Índice de Figuras

Figura 1.1. Distribución mundial de <i>Fasciola hepatica</i> y <i>Fasciola gigantica</i> , parásitos causantes de la fasciolosis.....	4
Figura 1.2. Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i> . ....	5
Figura 1.3. Principales etapas en la activación de linfocitos T por parte de células dendríticas...9	
Figura 1.4. Las células dendríticas son capaces de instruir diferentes fenotipos de linfocitos T. ....	11
Figura 1.5. Clasificación de los tipos de glicosilación más comunes en glicoproteínas presentes en tejidos animales. ....	14
Figura 1.6. Los glicanos presentes en helmintos son potenciales ligandos de diferentes lectinas tipo C. ....	17
Figura 1.7. Familia de DC-SIGN en humano (DC-SIGN, L-SIGN) y en ratón (SINGR). ....	19
Figura 1.8. Clasificación de métodos de inmovilización enzimática en reversibles e irreversibles. ....	23
Figura 1.9. Mecanismo de activación de la agarosa por el método CDAP para inmovilización de proteínas.....	24
Figura 3.1. <i>F. hepatica</i> induce una fuerte respuesta inmune de tipo Th2 modificada, caracterizada por altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-10.....	53
Figura 3.2. Análisis histológico de ratones control y ratones infectados durante 3 semanas. ...	54
Figura 3.3. <i>F. hepatica</i> produce una gran variedad de estructuras glucídicas. ....	56
Figura 3.4. La oxidación de los glúcidos presentes en FhTE conducen a una menor producción de IL-4 e IL-10 y un aumento de IFN $\gamma$ por esplenocitos ratones infectados. ....	58
Figura 3.5. La infección por <i>F. hepatica</i> promueve el reclutamiento de células dendríticas MHCII <sup>low</sup> IL-10 <sup>+</sup> tanto en la cavidad peritoneal como en el bazo. ....	59
Figura 3.6. Las células dendríticas de animales infectados presentan un fenotipo semi-maduro. ....	60
Figura 3.7. La infección por <i>F. hepatica</i> promueve el reclutamiento de macrófagos productores de IL-10 tanto en la cavidad peritoneal como en el bazo. ....	61
Figura 3.8. Caracterización fenotípica de las BMDCs. ....	63
Figura 3.9. Las BMDCs cargadas con FhmPox inducen una menor producción de IL-4 e IL-10 por linfocitos T CD4 <sup>+</sup> que BMDCs cargadas con FhTE. ....	64
Figura 3.9. Los glicoconjugados de <i>F. hepatica</i> interactúan con y son internalizados por células dendríticas en un proceso mediado por CLR <sup>s</sup> específicos de manosa. ....	65

Figura 3.10. Determinación de la concentración de inhibidores a utilizar en la preparación de FhTE. ....	67
Figura 3.10. La oxidación de los componentes parasitarios inhibe parcialmente la modulación de la maduración de células dendríticas inducida por LPS. ....	68
Figura 4.1. Estrategia utilizada para el análisis de la deglicosilación enzimática de glicoproteínas modelo. ....	78
Figura 4.2. Análisis de la deglicosilación utilizando $\beta$ -galactosidasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas. ....	79
Figura 4.3. Reconocimiento de la asialofetuina degalactosilada por las lectinas PNA y ConA. ..	80
Figura 4.4. Análisis de la deglicosilación utilizando $\alpha$ -manosidasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas. ....	81
Figura 4.5. Reconocimiento de la lactoferrina demanosilada por las lectinas PNA y ConA. ....	81
Figura 4.6. Determinación de la estructura de los N-glicanos presentes en la lactoferrina control y en la tratada con $\alpha$ -manosidasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas ..	82
Figura 4.7. Estudio del reconocimiento de la lactoferrina demanosilada o control por parte de los receptores DC-SIGN y Receptor de Manosa. ....	83
Figura 4.8. Estudio de reconocimiento de los diferentes extractos parasitarios con diferente perfil glucídico por PNA y ConA. ....	84
Figura 4.9. Capacidad de inducir respuestas tipo Th2 modificadas en linfocitos T CD4 de ratones infectados por parte de BMDCs cargadas con extractos parasitarios con diferente perfil glucídico. ....	85
Figura 5.1. Los glicoconjugados de <i>F. hepatica</i> potencian la producción de IL-10 por células dendríticas estimuladas con ligandos de TLR. ....	94
Figura 5.2. FhTE no señala a través de TLR4 o TLR2, al igual que no afecta la viabilidad de las moDCs. ....	95
Figura 5.3. Los glicoconjugados presentes en FhTE son internalizados por el MR y DC-SIGN. ...	96
Figura 5.4. DC-SIGN potencia la producción de IL-10 e IL-27p28 por moDCs estimuladas con LPS. ....	97
Figura 5.5. DC-SIGN interactúa con estructuras glucídicas de FhTE que presentan manosa y fucosa. ....	98
Figura 5.6. N-Glicanos presentes en FhTE se caracterizan por un alto contenido en estructuras de manosa. ....	100
Figura 5.7. FhTE es capaz de modular la capacidad de estimulación de moDCs. ....	101
Figura 5.8. Infección por <i>F. hepatica</i> induce un aumento de células T reguladoras y productoras de IL-10 en bazo y peritoneo. ....	103

Figura 5.9. El silenciamiento de CD209a restaura la producción de IL-12/23p40 por BMDC estimuladas con FhTE/LPS, pero no afecta la estimulación de linfocitos T..... 104

Figure 5.10. Ilustración esquemática resumiendo los principales hallazgos del presente capítulo. .... 107

Figure 6.1. MGL reconoce glicoconjugados de *F. hepatica* y potencia la producción de IL-10 y TNF $\alpha$  por moDCs maduras por ligandos de TLR. .... 113

Figure 6.2. FhTE es capaz de inducir una polarización Th2 a través de la reducción de IFN $\gamma$ ... 114

Figure 6.3. Caracterización de los glicoconjugados que son reconocidos por hMGL. .... 116

Figure 6.4. Células mMGL<sup>+</sup> son reclutadas al peritoneo durante la infección por *F. hepatica*. 118

Figura 6.6. Análisis funcional de células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup>..... 121

Figure 6.7. Expresión de lectinas tipo C, quimioquinas y moléculas reguladoras en células CD11c<sup>+</sup> de animales infectados y no infectados. .... 123

Figura 6.8. Ilustración esquemática resumiendo los principales hallazgos del presente capítulo. .... 128

Figure 7.1. Resumen esquemático de las interacciones entre *Fasciola hepatica* y diferentes CLRs. .... 133

Figure 7.2. Hipótesis integradora de los resultados obtenidos en la presente tesis. .... 136

**Índice de Tablas**

Tabla 1.1. Principales helmintiasis: Prevalencia mundial y distribución. ....3

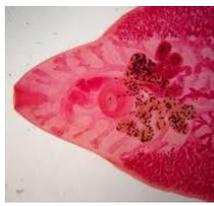
Tabla 1.2. Principales características de la inmunidad adaptativa y de la inmunidad innata. .... 7

Tabla 1.3. Principales etapas en la activación de linfocitos T por parte de células dendríticas. . 10

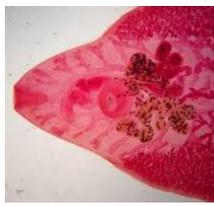
Tabla 2.1. Anticuerpos específicos contra diferentes proteínas humanas y murinas utilizados en la presente tesis. .... 35

Tabla 3.1. Estudio del daño hepático en ratones infectados con diferentes dosis de metacercarias..... 54

Tabla 4.1. Inmovilización de glicosidasas..... 76



- BMDCs – Células dendríticas murinas derivadas de médula ósea  
CDAP-BF<sub>4</sub> - Ciano-4-dimetil-amino-piridinio tetrafluoro borato  
CLR – Receptor Lectina Tipo C  
CTL – Linfocito T CD8<sup>+</sup> citotóxico  
DC-SIGN – Receptor de ICAM3 no integrina específico de células dendríticas  
DCIR – Inmunoreceptor de células dendríticas  
EGTA – Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético  
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético  
Fc – Fracción constante de inmunoglobulinas  
FhTE – Extracto total de gusanos adultos de *Fasciola hepatica*  
FhmPox – FhTE oxidado con meta-periodato de sodio  
FhCB – Control de oxidación con meta-periodato de sodio – Tratado únicamente con borhidruro de sodio.  
GalNAc/GlcNAc – N-acetil Galactosamina / N-acetil Glucosamina  
GAPDH – Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
GM-CSF – Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos  
IL- – Interleuquina  
IFN $\gamma$  – Interferón gamma  
IRF4 – Factor 4 regulador de interferón  
LPS – Lipopolisacárido – Ligando de TLR4  
MFI – Media de intensidad de fluorescencia  
MGL – Lectina de macrófagos específico para Gal/GalNAc  
MHC – Complejo Mayor de Histocompatibilidad  
moDCs – Células dendríticas humanas derivadas de monocitos  
MR – Receptor de Manosa  
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio  
NEJ – Juveniles recién desenquistados  
OMS – Organización Mundial de la Salud  
PD-1 – Molécula asociada a la muerte programada tipo 1  
PD-L1/2 - Ligandos de PD-1  
PECs – Células del exudado de la cavidad peritoneal  
PRR – Receptor de reconocimiento de patrones  
TCR – Receptor de Linfocitos T  
TGF $\beta$  – Factor de crecimiento tumoral beta  
Th – Linfocito T CD4<sup>+</sup> colaborador  
TNF $\alpha$  – Factor de necrosis tumoral alfa  
TLR – Receptor de tipo Toll



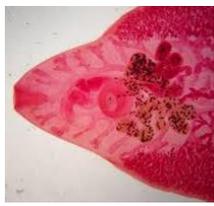
*"Solos podemos hacer muy poco;  
juntos podemos hacer muchísimo."*

*Helen Keller*

A lo largo del desarrollo de esta tesis, son muchas las personas que de alguna forma contribuyeron a la misma y a las que me gustaría agradecer:

- En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras de Tesis: la Dra. Teresa Freire y la Dra. Cecilia Giacomini, por ser grandes responsables de mi amor por la ciencia, por su gran dedicación y generosidad, por su ayuda y apoyo constante, por la libertad que me dieron para trabajar y por contribuir enormemente a mi formación, no sólo como investigador, sino que también como persona. Estoy muy contento con el gran equipo que formamos y que logramos consolidar una linda colaboración entre dos líneas de investigación que, si bien diferentes, son sumamente complementarias y que estoy seguro dará muy buenos frutos en el futuro.
- A mis compañeros de laboratorio en Facultad de Medicina: Carolina, Natalie, Verónica, Paula, Enrique, Valeria y Sofía. A Carolina, por su compañerismo y amistad durante todo mi pasaje por el laboratorio, por siempre estar dispuesta a dar una mano y por todas esas charlas y risas compartidas. A Natalie, por su buen humor siempre, por su ayuda con el análisis histológico y por hacer mucho más divertidas esas idas al frigorífico. A Verónica, por ser quien, junto con Enrique, me ayudó durante mis primeros pasos en el laboratorio y por su contribución con las infecciones y las idas al frigorífico. A Paula, por su buena onda, por darme una gran mano con todas las infecciones, inclusive si terminábamos de procesar todo a las 5 am, y por continuar algunos ensayos que quedaron pendientes cuando ya no estaba en el laboratorio. A Valeria y Sofía, por dar una gran mano con las últimas infecciones.
- A mis compañeros de laboratorio en Facultad de Química: Cecilia, Karen, María José, Miriam. A Cecilia, por su gran ayuda cuando comensaba a trabajar en la inmovilización de enzimas, por siempre estar dispuesta a dar una mano y por 'soportar' que le usara su mesada cada vez que iba al laboratorio. A Karen, por su gran trabajo en la inmovilización de enzimas sobre agarosa. A María José, por ayudarme cuando intentamos realizar la inmovilización de lectinas. A Miriam, por su ayuda con los ensayos de proteasas. También, un especial agradecimiento a toda la "Barra Joven" (que ya no es tan así ;), por su compañerismo, por hacer más divertido el trabajar en el laboratorio, por esas charlas filosóficas sobre la vida y la ciencia y por esas cervezas compartidas.

- A todo el resto del Departamento de Inmunobiología de Facultad de Medicina y el Área de Bioquímica de Facultad de Química, por todos los buenos momentos vividos juntos.
- Al Dr. Juan J. García-Vallejo por ser casi un orientador más durante esta tesis, por su apoyo constante y por la libertad con la que me permitió trabajar durante mi pasantía en Ámsterdam. A Yvette van Kooyk, por permitirme realizar una pasantía en su laboratorio y por sus valiosas sugerencias. A Sandra van Vliet, por sus grandes aportes a esta tesis, en particular en el trabajo con MGL. A Juan Martín Ilarregui, por ser un gran compañero en el laboratorio de Ámsterdam y por siempre estar dispuesto a ayudar cuando fue necesario.
- A la Dra. Laura Cervi, por recibirme con las puertas abiertas en su laboratorio y por todas esas enriquecedoras charlas que tuvimos cuando recién comenzaba esta tesis. Al Dr. Cristian Falcón, por su gran compañerismo y por hacer más divertida y productiva mi pasantía en la Universidad Nacional de Córdoba.
- A todos en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, por siempre estar dispuestos dar una mano cuando la necesitaba.
- A Vicky, Mónica, Miguel, Diego, Nico y todo el personal del LOBBM, por toda su buena onda y ayudar a que el trabajo sea más fácil.
- A María Laura Chiribao por su ayuda con mis primeros ensayos de qRT-PCR.
- A todos mis amigos de la vida, que siempre están al firme para acompañar, para charlar, para animar o para tomarse una cerveza.
- A PEDECIBA, CSIC, ANII y Amsud-Pateur por el apoyo económico para el desarrollo de ésta tesis.
- Finalmente, quiero terminar agradeciendo a las personas más importante para mi: mi Familia. A mis padres, Mario y María, por siempre darme para adelante, por apoyarme y acompañarme en todo momento, por estimularme constantemente a ser una mejor persona y un mejor profesional, pero, por sobre todas las cosas, por todo su amor y cariño. A mis hermanos, Gonzalo y Claudio, por su apoyo siempre, por estar ahí si los necesitaba, por aguantarme cuando las cosas estaban complicadas (léase Concursos), por todas esas conversaciones sobre la vida y la ciencia.



Los parásitos helmintos expresan diferentes glicoconjugados en su superficie y liberan productos de excreción-secreción ricos en diferentes glicanos que pueden ser muy importantes en su ciclo de vida, infección y patología. Evidencias recientes sugieren que los glicoconjugados de parásitos helmintos podrían desempeñar un papel en la evasión de la respuesta inmune, lo que lleva a una polarización de las respuestas inmunes hacia un perfil Th2 modificado, que favorece la supervivencia del parásito en el hospedero. Sin embargo, existe poca información sobre la naturaleza o función de glicanos producidos por el trematodo *Fasciola hepatica*, el agente causante de la fasciolosis en nuestro país. En esta tesis, se investigó si las moléculas glicosiladas de *F. hepatica* participan en la modulación de la inmunidad del hospedero, enfocándonos en las células dendríticas.

Nuestros resultados indican que glicoconjugados de *F. hepatica* son capaces de promover la producción de IL-4 e IL-10, al igual que suprimir de la producción de IFN $\gamma$ . Durante la infección, este parásito es capaz de inducir un fenotipo semi-maduro en células dendríticas que expresan bajos niveles de MHCII y secretan IL-10. Además, se observó que los glicoconjugados parasitarios median la modulación de la maduración de células dendríticas inducida por LPS, ya que su oxidación con m-periodato de sodio restaura la capacidad de las células dendríticas tratadas con LPS para secretar altos niveles de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-12/23p40 y bajos niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Los ensayos de inhibición utilizando carbohidratos sugieren que la modulación inmune está mediada, al menos en parte, por el reconocimiento de CLRs específicos de manosa y mediante la señalización a través de la fosfatasa SHP2.

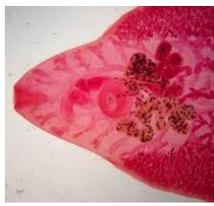
Con el fin de identificar las estructuras glucídicas que median este efecto, se utilizaron glicosidasas específicas ( $\alpha$ -manosidasa y  $\beta$ -galactosidasa), que fueron inmovilizadas sobre nanopartículas magnéticas. La eficacia de las glicosidasas inmovilizadas se demostró mediante el estudio de la degalactosilación y demanosilación selectiva de glicoproteínas modelo. Por último, la desglicosilación específica de un extracto total del parásito nos permitió mostrar la importancia de glicanos manosilados en la inducción de Th2 durante la infección.

Además, se evaluaron las propiedades inmunomoduladoras de los glicanos de *F. hepatica* sobre células dendríticas humanas, mostrando que éstos son capaces de aumentar la producción de las citoquinas IL-10 e IL-27p28 inducidas por ligandos de TLR. Asimismo, se observó que las propiedades inmunomoduladoras de glicanos están mediadas DC-SIGN, que reconoce glicanos parasitarios que contienen fucosa y manosa. Por otra parte, los glicoconjugados de *F. hepatica* inducen a través de DC-SIGN un programa regulador sobre las células dendríticas, capaces de

disminuir la proliferación de células T alogénicas, lo cual pone de manifiesto el papel de DC-SIGN en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa por *F. hepatica*. Por último, se observó que un homólogo murino de DC-SIGN, CD209a, limita la producción de IL-12 por BMDCs pero no influye en su capacidad de estimular linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Por otro lado, se observó un efecto diferente en las células dendríticas cuando se utilizan ligandos parasitarios inmovilizados. Nuestros resultados sugieren que el antígeno Tn expresado en la superficie de *F. hepatica* puede modular la maduración de las células dendríticas inducida por ligandos de TLR, en un proceso mediado por hMGL, conduciendo a un aumento en la producción de IL-10 y TNF $\alpha$ , y a la capacidad de dichas células de polarizar respuestas Th2. Asimismo, se observó que células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> F4/80<sup>low</sup> son reclutadas al peritoneo de ratones infectados, las cuales expresan las citoquinas reguladoras IL-10, TNF $\alpha$  y TGF $\beta$ , al igual que una variedad de marcadores asociados a la regulación del sistema inmune y presentan una menor capacidad estimuladora de linfocitos T alogénicos.

Los resultados presentados aquí contribuyen a comprender mejor la función de las moléculas glicosiladas de *F. hepatica* en la modulación de la inmunidad del hospedero y podrían ser útiles en el diseño de vacunas contra la fasciolosis.



Helminths express various carbohydrate-containing glycoconjugates on their surface, and they release glycan-rich excretion/secretion products that can be very important in their life cycles, infection and pathology. Recent evidence suggests that parasite glycoconjugates could play a role in the evasion of the immune response, leading to a modified Th2-polarized immune response that favors parasite survival in the host. Nevertheless, there is limited information about the nature or function of glycans produced by the trematode *Fasciola hepatica*, the causative agent of fasciolosis. In this thesis, we investigated whether glycosylated molecules from *F. hepatica* participate in the modulation of host immunity. We also focus on dendritic cells, since they are an important target of immune-modulation by helminths, affecting their activity or function.

Our results indicate that glycans from *F. hepatica* promote the production of IL-4 and IL-10, suppressing IFN $\gamma$  production. During infection, this parasite is able to induce a semi-mature phenotype of DCs expressing low levels of MHCII and secrete IL-10. Furthermore, we show that parasite glycoconjugates mediate the modulation of LPS-induced maturation of the dendritic cells since their oxidation restores the capacity of LPS-treated dendritic cells to secrete high levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-12/23p40 and low levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Inhibition assays using carbohydrates suggest that the immune-modulation is mediated, at least in part, by the recognition of a mannose specific-CLR that signals by recruiting the phosphatase Ptp2.

In order to evaluate the role of manose and galactose of parasite glycans in mediated the observed immunomodulation, we used specific glycosidases. To this end, we immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Asperillus oryzae* and  $\alpha$ -mannosidase of *Canavalia ensiformis* onto agarose and magnetic nanoparticles. Both of them are relevant tools for glycomic analysis.  $\beta$ -galactosidase for selective removal of terminal  $\beta$  1-4 galactose and  $\alpha$ -mannosidase for selective removal of  $\alpha$  1-2,  $\alpha$  1-3 and  $\alpha$  1-6 terminal mannoses. The effectiveness of the immobilized glycosidases was proved by studying the selective degalactosylation and demannosylation of model glycoproteins. Finally, the specific deglycosylation of a total extract of the parasite allowed us to show the importance of mannosylated glycans in the induction of Th2 during the infection.

We also evaluated the immunomodulatory properties of *F. hepatica* glycans on human monocyte derived dendritic cells (moDCs), demonstrating that they induce a strong production of TLR-induced IL-10 and IL-27p28. Furthermore, we show that the immunomodulatory

properties of glycans are mediated by DC-SIGN binding, which recognizes both mannose and fucose-containing parasite glycans. In addition, parasite glycans induce regulatory moDCs via DC-SIGN that decrease allogeneic T cell proliferation, highlighting the role of DC-SIGN in the regulation of innate and adaptive immune responses by *F. hepatica*. Finally, we demonstrate the murine DC-SIGN, CD209a, limits the production of IL-12 by BMDCs but does not influence T cell stimulatory capacity of DCs.

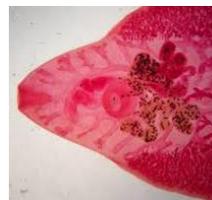
Interestingly, a different effect is observed when parasitic ligands coated on plates are used to stimulate dendritic cells. Our results suggest that the Tn antigen expressed in the surface of *F. hepatica* can modulate the TLR2-induced maturation of moDCs in a process mediated by hMGL by up-regulating the production of IL-10 and TNF $\alpha$ . Furthermore, we show that MGL2<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>o</sup> cells are recruited to the peritoneum of infected-mice. Interestingly, these cells express the regulatory cytokines IL-10, TNF $\alpha$  and TGF $\beta$  and a variety of regulatory markers.

The results presented here contribute to the understanding of the role of parasite glycosylated molecules in the modulation of the host immunity and might be useful in the design of vaccines against fasciolosis.

# Capítulo I: Introducción







## *Fasciola hepatica*

### Generalidades

La palabra “helminto” (derivada del griego ἕλμινθος) se utiliza como una denominación no taxonómica de un grupo diverso de organismos conocidos comúnmente como gusanos, ya sea parásitos o de vida libre. Existen dos grupos principales en los cuales se pueden clasificar los helmintos: los nematodos (también conocidos como gusanos redondos) y los platelmintos (gusanos planos).

Los parásitos helmintos representan un gran problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que cerca de un tercio de la población mundial se encuentra infectada por parásitos helmintos, siendo los más prevalentes aquellos que se muestran en la Tabla 1.1 [1]. De hecho, representan el principal agente infeccioso en países en vías de desarrollo, y se calcula que su impacto a nivel mundial sobre la salud pública supera a enfermedades más estudiadas, como la malaria o la tuberculosis [1]. A esto hay que sumarle el impacto negativo que las infecciones por parásitos helmintos tienen sobre animales productores, conduciendo a enormes pérdidas económicas a nivel global [2]. A pesar de todo esto, estas enfermedades han sido generalmente consideradas como secundarias y el apoyo a programas de investigación y desarrollo ha sido relegado, considerándose hoy por hoy como las principales “enfermedades tropicales desatendidas” [1].

**Tabla 1.1. Principales helmintiasis: Prevalencia mundial y distribución.** Extraído de [1].

Enfermedad	Agente Etiológico	Prevalencia Mundial	Regiones con alta prevalencia
<b>Geohelmintiasis</b>			
Ascariasis	<i>Ascaris lumbricoides</i>	807 millones	Regiones en desarrollo de Asia, África, y América Latina
Tricuriasis	<i>Trichuris trichiura</i>	604 millones	Regiones en desarrollo de Asia, África, y América Latina
Anquilostomiasis	<i>Necator americanus</i> <i>Ancylostoma duodenale</i>	576 millones	Regiones en desarrollo de Asia, África, y América Latina (Especialmente áreas rurales pobres)
Estrongiloidiasis	<i>Strongyloides stercoralis</i>	30–100 millones	Regiones en desarrollo de Asia, África, y América Latina (Especialmente áreas rurales pobres)
<b>Filariasis</b>			
Filariasis linfática	<i>Wuchereria bancrofti</i> <i>Brugia malayi</i>	120 millones	Regiones en desarrollo de India, Sudeste Asiático, y África sub-Sahariana
Oncocercosis	<i>Onchocerca volvulus</i>	37 millones	África sub-Sahariana
Loiasis	<i>Loa loa</i>	13 millones	África sub-Sahariana
Dracunculiasis	<i>Dracunculus medinensis</i>	0.01 million	África sub-Sahariana
<b>Plathelminths</b>			
Esquistosomiasis	<i>Schistosoma haematobium</i> <i>Schistosoma mansoni</i> <i>Schistosoma japonicum</i>	207 millones	África sub-Sahariana África sub-Sahariana y este de Brasil China and Sudeste Asiático
Trematodiasis transmitida por alimentos	<i>Clonorchis sinensis</i> <i>Opisthorchis viverrini</i> <i>Paragonimus spp.</i> <i>Fasciolopsis buski</i> <i>Fasciola hepatica</i>	>60 millones	Regiones en desarrollo Este Asiático Altiplano Peru-Bolivia
Cisticercosis	<i>Taenia solium</i>	0.4 million (Sólo América Latina)	Regiones en desarrollo de Asia, África, y América Latina y África sub-Sahariana

La fasciolosis es una parasitosis zoonótica causada por los helmintos del género *Fasciola*, siendo el parásito *Fasciola hepatica* considerada la causa principal debido a su amplia distribución mundial, mientras *Fasciola gigantica* se encuentra restringido principalmente al sur/sudeste asiático y a regiones tropicales de África (Figura 1.1).

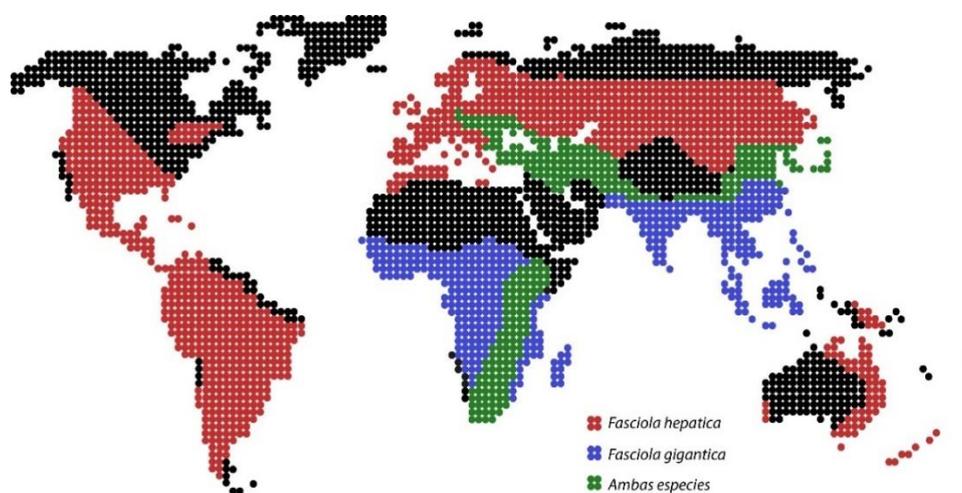


Figura 1.1. Distribución mundial de *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, parásitos causantes de la fasciolosis. Adaptado de [3].

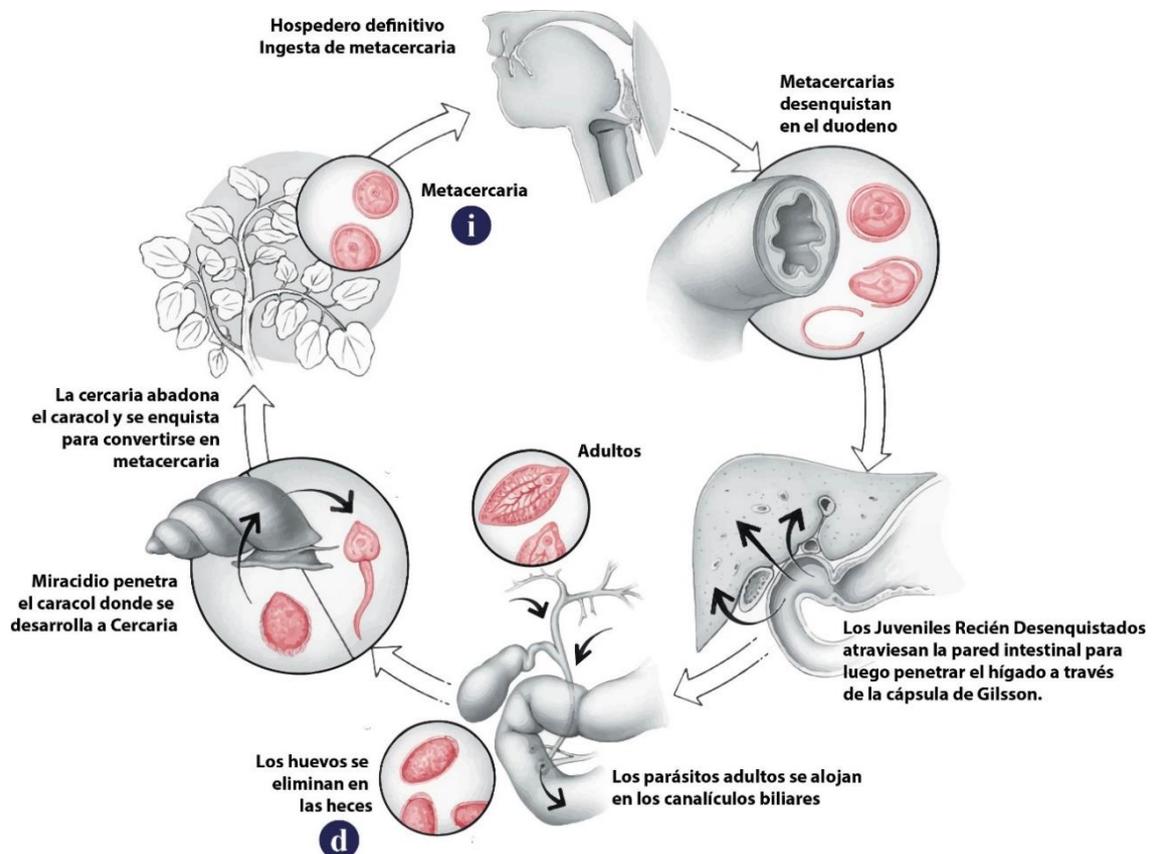
La fasciolosis ha sido tradicionalmente reconocida por sus efectos a nivel veterinario, con un importante impacto económico a nivel mundial con pérdidas estimadas en más de 3000 millones de dólares anuales, principalmente por disminución en la producción de leche, carne y lana, el decomiso de hígados y carne y el costo de las drogas fasciolicidas [2, 4]. Por el contrario, la fasciolosis humana ha pasado desapercibida durante décadas, siendo considerada como una enfermedad secundaria [2, 4]. Es a partir de la década de los 90 que la Organización Mundial de la Salud (OMS) decide profundizar en este tema debido a la aparición de reportes que sugerían que la infección por *Fasciola* spp. era más frecuente de lo pensado hasta ese momento, particularmente en el altiplano boliviano [2, 4]. De hecho, actualmente la OMS estima que la fasciolosis humana afecta a más de dos millones de personas y que cerca de 180 millones están en riesgo de infección [2, 5].

### Ciclo biológico

Al igual que otros parásitos helmintos, *Fasciola hepatica* posee un ciclo de vida complejo que presenta varios estadios (Figura 1.2). Involucra, asimismo, dos hospederos: uno intermediario (caracoles de agua dulce) y uno definitivo (mamífero herbívoro o el hombre). Éste último se infecta al ingerir vegetales contaminados con estadio infectivo: las metacercarias, una forma quística resistente del parásito. El pasaje por el estómago estimula su desenquistamiento, para

dar origen a los juveniles recién desenquistados en el duodeno. Éstos, atraviesan la pared intestinal y migran a través de la cavidad peritoneal hasta alojarse en el hígado, donde migran por el parénquima durante 8-12 semanas como juveniles inmaduros hasta llegar a los canalículos biliares, donde madura y se aloja el estadio maduro [6, 7].

Una vez llegada a su madurez, *F. hepatica* es capaz de producir una gran cantidad de huevos, estimado en 20.000-24.000 huevos por gusano por día, que son eliminados en las heces del hospedero definitivo [8]. La eclosión de los huevos se produce en agua, donde surge el miracidio, capaz de infectar al hospedero intermediario, un caracol de agua dulce [6, 7]. En nuestro país, la especie *Lymnea viatrix* es la única con relevancia epidemiológica [9]. Una vez en el caracol, se desarrolla y, mediante reproducción asexual, forma redias, que posteriormente darán origen a las cercarías, capaz de abandonar el caracol para finalmente perder la cola y enquistarse, dando lugar a la forma infectiva, la metacercaria, la cual generalmente se adhiere a la vegetación (Figura 1.2) [6, 7].



**Figura 1.2. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.** El ciclo biológico de *Fasciola hepatica* requiere de 2 tipos de huéspedes: el definitivo, que pueden ser animales herbívoros (bovinos, ovinos, caprinos, suinos, equinos, conejos, liebres, venados, otros) o el humano; o intermediario, los caracoles pulmonados de agua dulce del género *Lymnea* spp. (i) Estadío infectivo del parásito. (d) El diagnóstico puede realizarse mediante la observación de huevos en un coproparasitario. Modificado de [microbeworld.org](http://microbeworld.org)

### *Control y tratamiento*

La estrategia más importante desarrollada actualmente en los planes de tratamiento de la enfermedad, consiste en el empleo de drogas fasciolicidas, para minimizar la contaminación de los pastos con huevos [10]. A pesar de que los fármacos empleados son efectivos, no evitan el daño hepático producido y los animales no desarrollan inmunidad protectora por lo que se re-infectan fácilmente. Por otro lado, se han reportado cepas con resistencia frente al principal fármaco antihelmíntico, el Triclabendazol, principalmente en Europa, provocando la disminución de su eficacia [11, 12].

En este contexto, el desarrollo de estrategias de inmunoprofilaxis contra la fasciolosis resulta de gran interés. Sin embargo, éste hecho se ve dificultado ya que tanto en animales como humanos, los parásitos helmintos, como *F. hepatica*, establecen infecciones crónicas de larga duración, con una desregulación de la respuesta inmune del hospedador [13]. De hecho, hasta la fecha no existen a nivel comercial vacunas disponibles contra los principales helmintos parásitos y en particular contra *F. hepatica* [2, 14]. Por lo tanto, resulta fundamental poder dilucidar los mecanismos de inmunomodulación de éste parásito y los actores moleculares que participan en estos procesos.

### ***Sistema Inmunológico del hospedero definitivo***

El sistema inmunológico es el conjunto de estructuras y procesos biológicos encargados de defender al organismo de microorganismos agresores, entre otras funciones. El mismo está compuesto de una compleja red de células, tejidos y órganos capaces de distinguir entre estructuras presentes en células y tejidos de individuos sanos, y estructuras ajenas o asociadas diferentes patologías, para posteriormente desarrollar respuestas que permiten el ataque y eliminación de estas últimas. Éste sistema es exitoso en esta batalla, lo que se evidencia en que sólo en contadas ocasiones se presentan infecciones que resulten clínicamente evidentes, a pesar de estar en constante exposición a diferentes agentes potencialmente patogénicos. De hecho, aún en casos donde éstas se produzcan, el ulterior desarrollo de respuestas inmunes aún más complejas son capaces de contener y resolver la infección, contribuyendo a mantener la homeostasis [15].

Sin embargo, aún en ausencia de deficiencias en el sistema inmune de un individuo, éste no siempre es capaz de contener el ataque de los patógenos a los que está expuestos, lo cual desencadena complicaciones para la salud. De hecho, diversos patógenos han evolucionado

hasta adquirir sofisticadas estrategias para evadir las respuestas inmunes del hospedero, lo que hace aún más complejo el panorama [15].

En la presente sección, expondremos una breve reseña del sistema inmunológico y como éste puede desarrollar una variedad de tipos de respuesta dependiendo, en parte, del tipo de respuesta en función del patógeno en cuestión. Asimismo, discutiremos cómo estructuras glucídicas son capaces de moldear respuestas inmunes mediante su interacción con receptores específicos, desencadenando una gran variedad de efectos. Por último, veremos cómo los parásitos helmintos son capaces de modular la respuesta inmune del hospedero, para favorecer así su sobrevivencia y la persistencia de la infección; y repasaremos lo reportado hasta el momento sobre el rol de la glicosilación en dichos procesos.

*Las células dendríticas: orquestadores esenciales para la activación de la respuesta inmune adaptativa*

Tradicionalmente, los inmunólogos han clasificado las respuestas inmunes en dos tipos: respuestas inmunes innatas y respuestas inmunes adaptativas, cuyas principales características se enumeran en la Tabla 1.2.

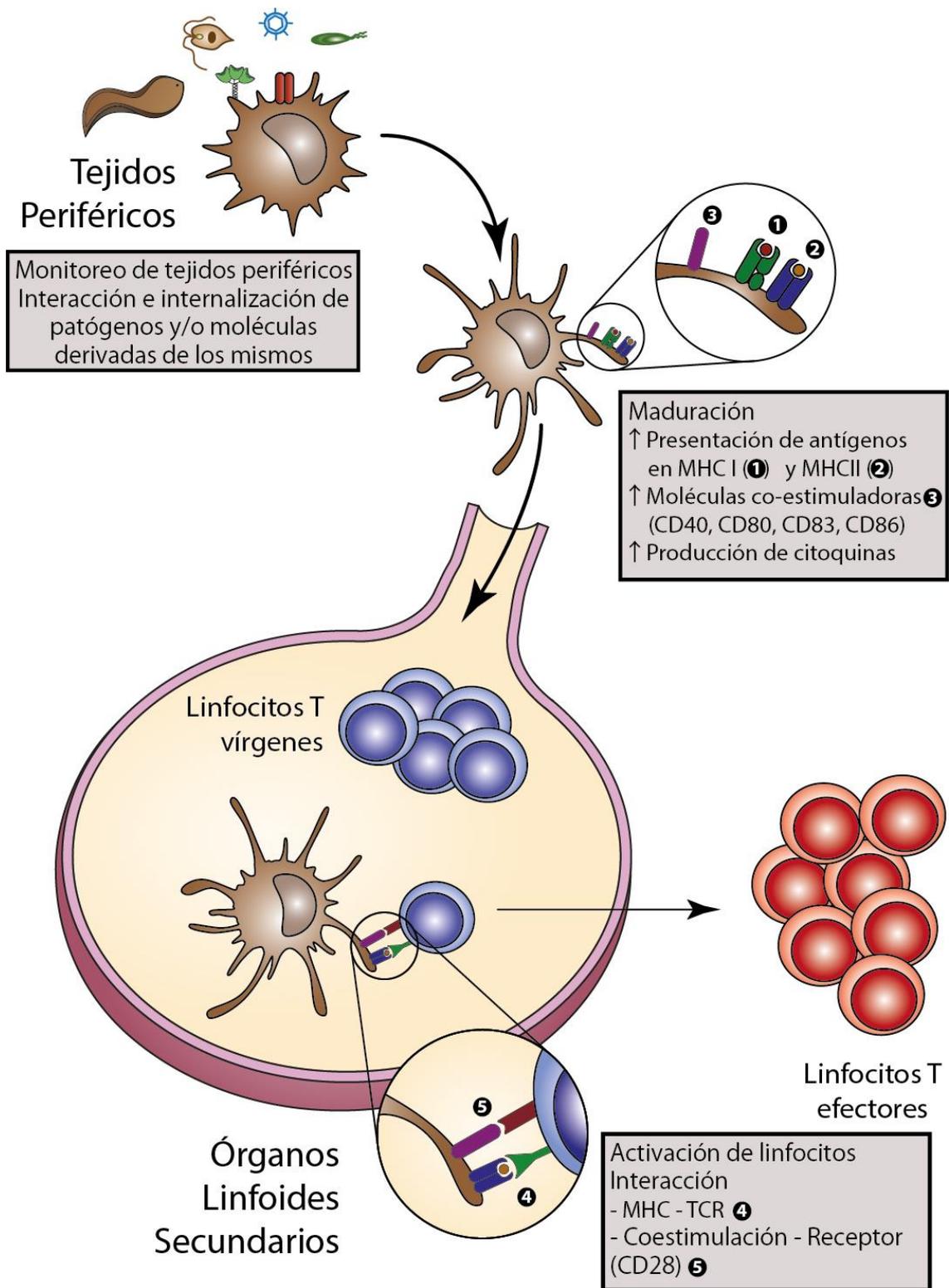
**Tabla 1.2. Principales características de la inmunidad adaptativa y de la inmunidad innata.**

	<b>Inmunidad</b>	
	<b>Innata</b>	<b>Adaptativa</b>
<b>Tiempo de respuesta</b>	Minutos / horas	Días / semanas
<b>Células principales</b>	Macrófagos, células asesinas naturales (NK), granulocitos, monocitos	Linfocitos T (CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> ) y Linfocitos B.
<b>Receptores</b>	Codificados en línea germinal (definidos en el genoma). Receptores de membrana: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptores tipo Toll (TLR)</li> <li>• Receptores tipo NOD (NLR)</li> <li>• Lectinas tipo C (CLRs)</li> </ul> Solubles: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ficolinas</li> <li>• Colectinas</li> <li>• Diversas Lectinas</li> </ul>	Variable por recombinación <ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor de linfocitos T (TCR)</li> <li>• Receptor de linfocitos b (BCR)</li> <li>• Inmunoglobulinas</li> </ul>
<b>Clonalidad</b>	El mismo receptor (con igual especificidad) puede encontrarse en varias células.	Cada célula tiene un receptor con especificidad única.

Sin embargo, si bien esta división es sumamente útil desde el punto de vista conceptual y didáctico, debemos tener en claro que ambos sistemas se encuentran estrechamente enlazados. De hecho, en la última década se han identificado una gran variedad de tipos celulares que presentan características asociadas tanto a la inmunidad innata como a la inmunidad adaptativa, lo que evidencia la complejidad del sistema inmune [16-18].

Las células dendríticas, las más eficientes células presentadoras de antígenos [19], constituyen un link entre la inmunidad innata y adaptativa. Están especializadas en la identificación de moléculas derivadas de patógenos o de células alteradas, así como en la captura de antígenos, siendo capaces de dirigir la respuesta inmune y de determinar el tipo de respuesta adaptativa inducida contra un antígeno [19]. La capacidad de presentación antigénica por las células dendríticas es particularmente remarcable ya que son las únicas células capaces de activar linfocitos T naive (vírgenes), induciendo su activación a linfocitos T efectores (Figura 1.3) [19, 20]. Luego de reconocer e internalizar moléculas exógenas en la periferia, las células dendríticas se activan durante el curso de una reacción inflamatoria local y migran por el sistema linfático o sanguíneo a los órganos linfoides secundarios en donde completan su maduración. Este proceso se encuentra acompañado por la pérdida de la capacidad de capturar antígenos, la producción de citoquinas pro-inflamatorias, el aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) así como el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y la adquisición de la capacidad de activación de los linfocitos T (Figura 1.3) [20].

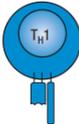
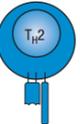
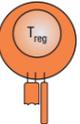
Asimismo, durante este proceso, las proteínas internalizadas por las células dendríticas son digeridas por una maquinaria proteolítica, lo que conduce a la generación de péptidos antigénicos que son capaces de unirse a las moléculas de MHC de clase I, mediante el proceso de cros-presentación, y MHC de clase II, en un mecanismo denominado procesamiento y presentación de antígeno. Una vez en los órganos linfoides secundarios, los linfocitos T pueden reconocer estos complejos MHC-péptido a través del receptor de linfocitos T (TCR), lo que representa la primera señal para su activación. Requieren además de una segunda señal, proveniente de las moléculas co-estimuladoras presentes en las células dendríticas. Estas moléculas son una señal de peligro, que indican la necesidad de desarrollar una respuesta inmune y, por lo tanto, la activación de linfocitos.



**Figura 1.3. Principales etapas en la activación de linfocitos T por parte de células dendríticas.** Las células dendríticas se encuentran realizando un monitoreo continuo de los tejidos periféricos, y son capaces de reconocer estructuras presentes en patógenos o células alteradas. La interacción e internalización de dichas estructuras por las células dendríticas conduce a su maduración y migración hacia los órganos linfoides secundarios. Allí son capaces de activar linfocitos T, mediante la interacción de los complejos MHC-péptido con los receptores de linfocitos T (TCR) y las moléculas co estimuladoras con el receptor CD28.

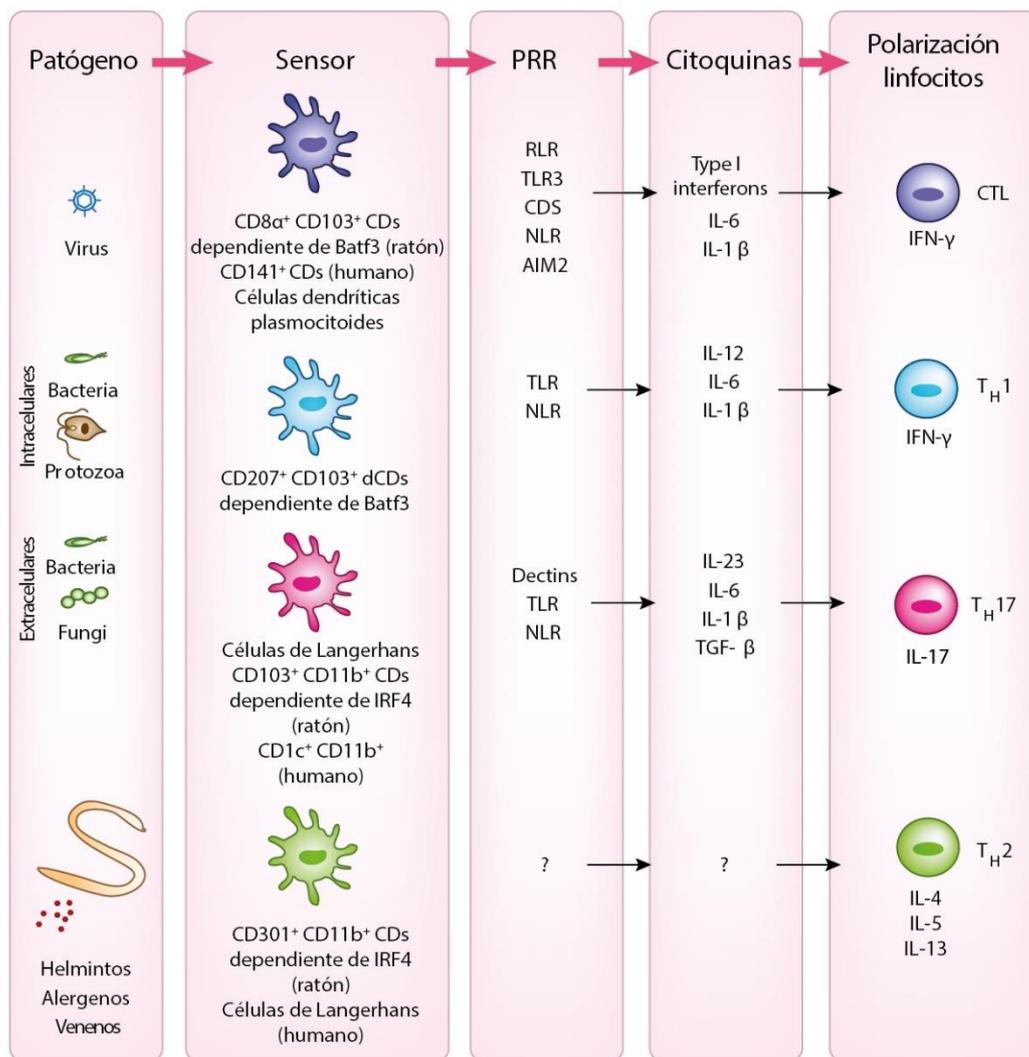
Es importante mencionar aquí que los linfocitos T pueden ser divididos en dos poblaciones mayoritarias: aquellos que presentan el co-receptor CD8 o las que poseen CD4 (llamados además como linfocitos colaboradores). Dichas poblaciones presentan funciones efectoras diferentes y complementarias. Los linfocitos CD8<sup>+</sup> reconocen complejos MHC I-péptido para diferenciarse en células efectoras citotóxicas que reconocen y destruyen a las células infectadas o tumorales. Por otro lado, los linfocitos colaboradores CD4<sup>+</sup> presentan un repertorio más flexible de actividades efectoras. Una vez que son activadas por reconocimiento de complejos MHC II – péptido, pueden diferenciarse por distintas vías que generan subgrupos efectoras con diferentes funciones inmunitarias. Cada tipo de respuesta inmune adaptativa inducida se asocia a un perfil de citoquinas determinado, que inducirá la producción y activación de una serie de actores celulares y/o moleculares destinados a atender diferentes situaciones de infección (Tabla 1.3) [21]. En la presente tesis, nos referiremos principalmente a la subpoblación CD4<sup>+</sup>, salvo se aclare lo contrario.

**Tabla 1.3. Principales etapas en la activación de linfocitos T por parte de células dendríticas.** Extraído de [22].

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

Las células dendríticas juegan un papel preponderante en la activación de las células T. Éstas inducen el desarrollo de diferentes fenotipos de células T dependiendo de la naturaleza de la célula dendrítica y cuáles son los receptores a través de los cuales interacciona con los patógenos involucrados, derivando en un perfil de citoquinas, moléculas de membrana y/o co-receptores característicos, conduciendo a la diferenciación de linfocitos T cooperadores a tipo-Th1, -Th2 o -Th17 [21]. De hecho, se ha reportado que diferentes patógenos son capaces de activar determinadas sub-poblaciones de células dendríticas, conduciendo a la activación de alguna rama particular de linfocitos colaboradores (Figura 1.4) [23]. De esta forma, se ha visto que respuestas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL) son inducidas por células dendríticas CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dependiente de Batf3 y células dendríticas CD103<sup>+</sup> (ratón) y su contraparte CD141<sup>+</sup> en humanos.

La inmunidad mediada por Th1 requiere la estimulación de la subpoblación de células dendríticas dermales (dCDs) CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>. Respuestas Th17 son inducidas por células dendríticas CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> al igual que por células de Langerhans en ratón, mientras que en humano éste tipo de respuesta es inducido por células dendríticas CD1c<sup>+</sup>. Finalmente, la inmunidad mediada por respuestas Th2 requiere células dendríticas CD301b<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> dependiente de IRF4 (ratón). Estas células representan la mayoría de células dendríticas dermales (dCD) y son distintas a las CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>. En contraste, células de Langerhans inducen Th2 *ex vivo* (Figura 1.4) [23].



**Figura 1.4. Las células dendríticas son capaces de instruir diferentes fenotipos de linfocitos T.** Diversos estudios han sugerido una relación entre el subtipo de célula dendrítica y el tipo de polarización de linfocitos T. Diversas subpoblaciones de células dendríticas pueden interactuar con diferentes patógenos a través de receptores de reconocimientos de patógenos específicos (PRR, por su sigla en inglés), lo cual conduce a la expresión de diferentes citoquinas. Dichas citoquinas son capaces luego de estimular la polarización de linfocitos T hacia diferentes ramas. Extraído de [23].

Sin embargo, existen también células dendríticas reguladoras con funciones de inducción de tolerancia o de diferenciación de linfocitos T reguladores [19]. Se ha visto que dichas células dendríticas comparten la capacidad de regular o inhibir la activación de células T efectoras, de inducir anergia y/o de inducir y promover el desarrollo y la expansión de células T reguladoras [24].

Por lo tanto, las células dendríticas constituyen un linaje celular plástico, capaz de procesar e integrar señales del microambiente celular. Bajo condiciones pro-inflamatorias las células dendríticas estimuladoras promueven una respuesta inmune efectiva estimulando la proliferación de células T y moldeando la respuesta de células T hacia fenotipos Th1, Th2 o Th17. Esto le permite al sistema inmune eliminar patógenos y células alteradas. En un microambiente tolerogénico, las células dendríticas adquieren funciones reguladoras, suprimiendo la activación de células T y favoreciendo la infección por patógenos [20].

### ***Inmunomodulación por parásitos helmintos***

Los parásitos helmintos representan uno de los agentes infecciosos más prevalentes en el mundo, lo cual es fiel reflejo de su capacidad de modular la respuesta inmune protectora del hospedero [13, 14, 25]. Han co-evolucionado con el sistema inmune de los vertebrados, lo que ha llevado a desarrollar sofisticadas estrategias que permiten una mayor sobrevivencia de los gusanos en el hospedador infectado [26]. La infección por éste tipo de parásitos representa un gran desafío para nuestro sistema inmune, tanto por el tamaño del organismo patógeno como por su capacidad de producir moléculas inmunomoduladoras, que le permiten evadir el ataque por parte del hospedero [27].

Inducen clásicamente una respuesta inmune de tipo Th2 modificada, pudiendo suprimir respuestas inflamatorias, ocasionando que el hospedero posea mayor susceptibilidad a infecciones secundarias que requieren una inmunidad Th1 [28-31]. De hecho, se ha reportado que la fasciolosis se asocia con un aumento de la susceptibilidad a infecciones por *Salmonella dublin* o *Bordetella pertussis* y que, además, reduce la capacidad predictiva de un test de detección de la tuberculosis bovina basado en la producción de INF $\gamma$  específica contra *Mycobacterium bovis* [31-33].

Se han identificado cisteín-proteasas secretadas por el adulto de *F. hepática* capaces de clivar los anticuerpos IgG, en un sitio próximo al sitio de corte de la papaína [34]. En humanos se ha caracterizado la acción de dos subtipos de catepsinas del parásito (L1 y L2) en la degradación de

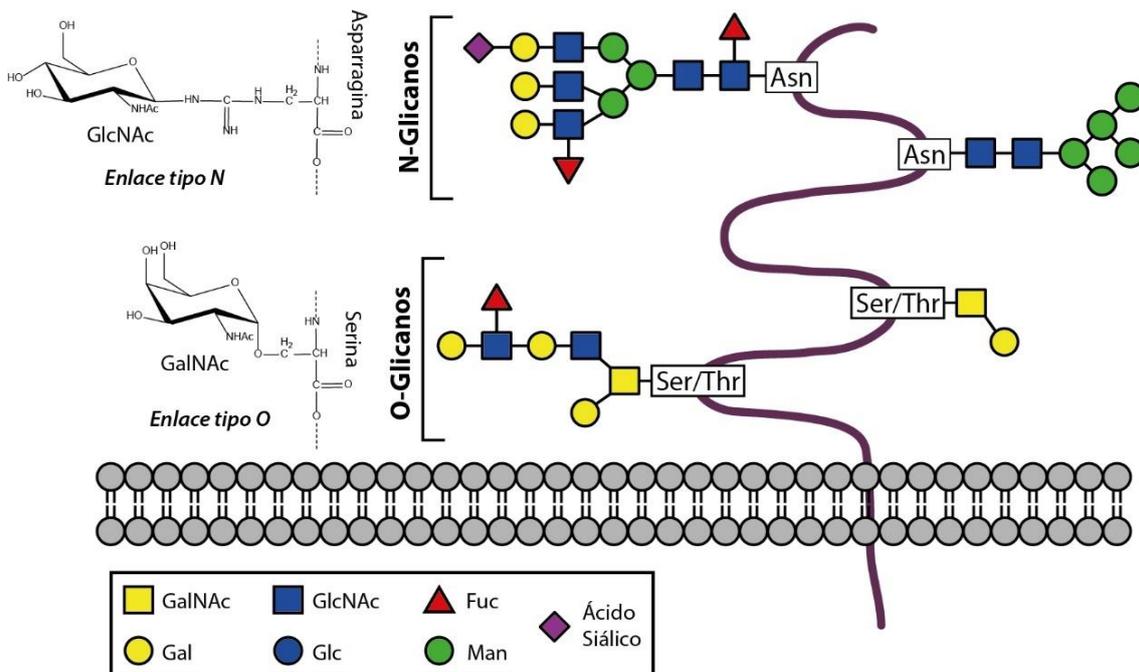
las diferentes subclases de anticuerpos IgG [35] hecho que contribuiría a la evasión del sistema inmune del hospedero por parte del parásito. Por otro lado, se ha descrito que la proteasa catepsina L de *F. hepatica* previene la adhesión de los eosinófilos a los estadios juveniles recién desenquistados (NEJ) [36].

Asimismo, en la última década numerosos estudios han reportado que la infección con parásitos helmintos reduce los síntomas en modelos animales de enfermedades autoinmunes y alergia [37-44]. De hecho, pacientes con esclerosis múltiple que presentan infecciones con parásitos helmintos presentan una enfermedad menos severa, lo cual está asociado a un mayor número de linfocitos T reguladores [45]. Interesantemente, dicha mejoría en los síntomas de esclerosis múltiple se pierde una vez que los pacientes son tratados con drogas anti-helmínticas [46]. Esto ha llevado a postular la utilización de productos derivados del mismo como herramientas terapéuticas en enfermedades autoinmunes [31, 47]. En el caso particular de *F. hepatica*, estudios recientes muestran que tanto la infección con dicho parásito como sus productos de excreción-secreción son capaces de atenuar los síntomas clínicos en un modelo murino de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental mediante la supresión de respuestas Th1 y Th17, y donde las citoquinas TGF $\beta$  e IL-33 juegan un papel principal [39, 48].

Uno de los mecanismos involucrados comprende la modulación de la función de las células dendríticas [25]. Estudios recientes han reportado que células dendríticas tratadas con determinados antígenos de parásitos helmintos, carecen de algunos marcadores de maduración clásicos, como pueden ser moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, MHCII, CD40) y/o una producción disminuida de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF $\alpha$ ) [49-53]. Incluso, la maduración de células dendríticas inducida por agonistas de Receptores tipo Toll (TLR) puede ser inhibida por antígenos helmínticos [53-57]. Este fenotipo de células dendríticas, donde algunos marcadores clásicos de maduración se encuentran ausentes o disminuidos suele denominarse como “semi-maduro” y se lo ha asociado a la inducción de respuestas tolerogénicas [50, 56-58]. Recientemente se ha reportado que antígenos de *F. hepatica* inducen propiedades tolerogénicas en células dendríticas maduras con CpG (agonista del TLR9), y que éstas pueden reducir los síntomas de un modelo murino de artritis inducida por colágeno [56]. En conclusión, antígenos de *F. hepatica* son capaces de suprimir la activación y función de células dendríticas, promoviendo la inducción de respuestas ineficaces en la eliminación del parásito [31, 55, 59].

## Glicosilación

Los glicanos que forman parte de las glicoproteínas y los glicolípidos participan en importantes procesos biológicos tanto a nivel estructural como funcional [60]. A nivel estructural cumplen un papel fundamental en la composición de la matriz extracelular y tienen la capacidad de conferir estabilidad, resistencia proteolítica y solubilidad a diversas proteínas secretadas. Por otro lado, a nivel funcional, estos glicococonjugados participan en procesos enzimáticos o de reconocimiento biológico como la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular, fundamentales en la modulación de la respuesta inmune, desarrollo embrionario, diferenciación, cáncer e interacción huésped-patógeno [61-64].



**Figura 1.5. Clasificación de los tipos de glicosilación más comunes en glicoproteínas presentes en tejidos animales.**

Los glicanos presentes en glicoproteínas pueden clasificarse según el enlace de unión entre las estructuras glucídicas y el esqueleto peptídico. Si bien existen diferentes tipos de glicosilación, nos centraremos en los dos tipos más comunes y mejor caracterizados en células animales: los N- y los O- glicanos. En los primeros, los glicanos se encuentran unidos mediante un enlace N-glicosídico formado entre el carbono anomérico del carbohidrato en cuestión (generalmente un residuo de GlcNAc) y la amina presente en la cadena lateral del aminoácido asparragina. En los O-glicanos, se encuentra presente un enlace O-glicosídico entre el grupo hidroxilo de los aminoácidos Serina o Tronina y el carbono anomérico del sacárido, siendo éste comúnmente GalNAc.

En las glicoproteínas, uno o más glicanos están unidos covalentemente al esqueleto polipeptídico, en general a través de enlaces N- u O- glicosídicos. De esta forma, existen dos tipos principales de glicosilación de proteínas: la N- y la O-glicosilación, dependiendo del tipo de enlace de unión entre el esqueleto peptídico y el glúcido. En las N-glicoproteínas los

carbohidratos se unen al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparragina. En O-glicoproteínas el punto de unión es el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina y treonina (Figura 1.5). Los carbohidratos que se unen directamente a estos sitios son normalmente N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina, respectivamente [60].

Asimismo, además de las glicoproteínas, se pueden encontrar otras estructuras glicosiladas de gran importancia biológica, como los glicolípidos [60]. Éstos representan compuestos que contienen uno o más monosacáridos unidos mediante un enlace glicosídico a una estructura hidrofóbica como un acilglicerol, una ceramida o un prenil fosfato [65]. La mayoría de ellos se encuentran en estructuras membranosas de la célula, con dos tercios presentes en membranas intracelulares como el aparato de Golgi, endosomas, lisosoma, membrana nuclear o mitocondria [65].

Las moléculas glicosiladas están involucradas en numerosos procesos patológicos. De hecho, determinados cambios en los perfiles de glicosilación se correlacionan con diversas patologías [66, 67]. Por ejemplo, en las células cancerosas una de las principales modificaciones moleculares es la expresión de antígenos producidos por O-glicosilación incompleta, la cual ha servido como base para el diagnóstico oncológico [62]. Por otra parte, se han descrito que defectos en genes que codifican proteínas involucradas en las vías de glicosilación, conducen a trastornos congénitos con serias consecuencias médicas [66, 67]. Asimismo, los glicoconjugados juegan un rol en la interacción entre parásito y hospedero [64]. La superficie de los mismo está cubierta por un glicocalix que conteniendo una gran diversidad estructuras glucídica, por lo que se encuentran expuestas para entrar en contacto con moléculas y células del hospedero, siendo importante para su sobrevivida y virulencia [64].

### *Rol de los glicanos en la inmunomodulación inducida por parásitos helmintos*

Actualmente, amplia evidencia demuestra que motivos glucídicos presentes en parásitos helmintos participan en la modulación del sistema inmune. Por ejemplo, la capacidad de polarizar una respuesta Th2 de extractos de los nemátodos *Caenorhabditis elegans* y *Brugia malay* depende de la integridad de las estructuras glucídicas [68]. La estructura glucídica LDNFII (lacto-N-fucopentaose III), presente en parásitos helmintos, es capaz de inducir la expresión de IL-10 por parte de macrófagos y células dendríticas [69]. Asimismo, estudios recientes muestran que glicanos presentes en huevos de *Schistosoma mansoni* participan de la polarización Th2, a través de la modulación de la función de las células dendríticas [26, 70]. Esta propiedad está asociada principalmente a la ribonucleasa Omega-1, una glicoproteína internalizada vía el

receptor de manosa (MR) expresado por células dendríticas [71]. Por otro lado, la glicoproteína ES-62, secretada por el nematodo *Acanthocheilonema viteae*, tiene efectos protectivos en modelos de alergia y artritis inducida por colágeno [72, 73]. Otros glicanos presentes en helmintos, como el antígeno glucídico Lewis<sup>x</sup> y N-glicanos conteniendo cores  $\alpha$ 3fucosa o  $\beta$ 2xylosa, también han sido asociados a la inducción de respuestas Th2 [26, 74].

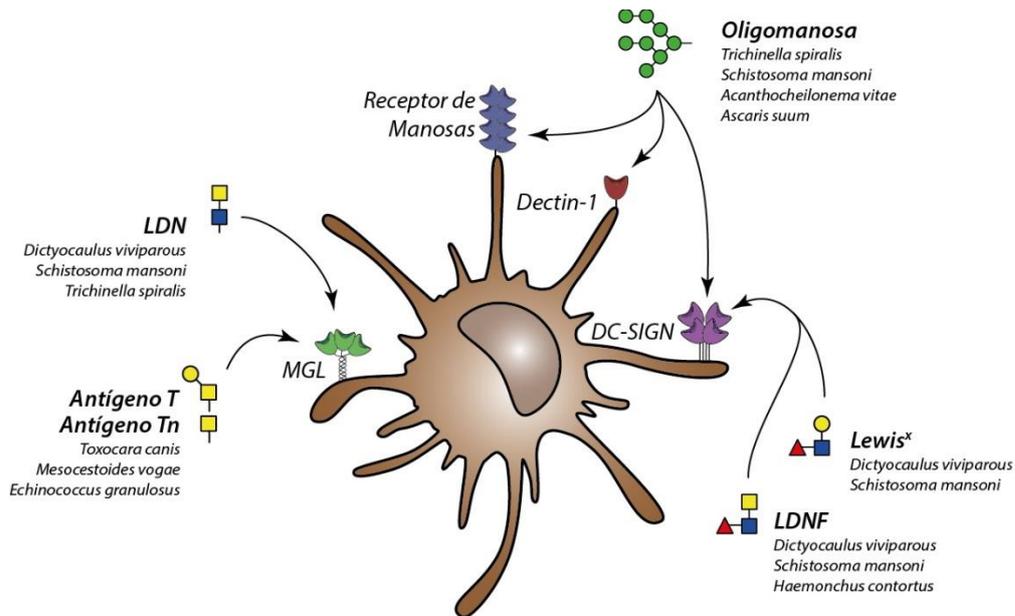
A pesar de que toda esta evidencia pone de manifiesto el rol de los glicanos en la modulación del sistema inmune por parásitos helmintos, la información relativa a los glicanos de *F. hepatica* es bastante escasa. Recientemente, se ha reportado que estructuras glucídicas presentes en productos de excreción-secreción participan en procesos de inmunomodulación, como la inducción de apoptosis en eosinófilos y la activación alternativa de macrófagos, aunque no se han caracterizado los glicanos en cuestión [75-77]. A pesar de estos avances, hasta el comienzo de esta tesis no había evidencia de la participación de los glicanos de *F. hepatica* en la modulación de la función de células dendríticas.

### **Lectinas tipo C**

La información biológica que es portada por los glicoconjugados es decodificada por el sistema inmune a través de la interacción con diferentes receptores celulares, dentro de los cuales se encuentran los receptores lectina tipo C (CLRs, del inglés C-type-lectin-receptors).

El término “receptores lectina de tipo C”, hace referencia a un grupo de proteínas que reconocen y unen carbohidratos (lectinas) de forma  $\text{Ca}^{+2}$ -dependiente [78]. Los mismos participan en diversos procesos biológicos, como por ejemplo en la adhesión celular, regulación de la función o activación celular, activación del complemento, remodelado tisular, activación plaquetaria, endocitosis o fagocitosis [79]. Las células dendríticas expresan una variedad abundante de CLRs, capaces de reconocer carbohidratos derivados de moléculas de origen viral, bacteriano, fúngico, parasitario, o incluso, tumoral [79]. Además, estos receptores pueden presentar funciones en la adhesión celular entre las células dendríticas y células endoteliales o células T [79, 80].

El estudio de los glicanos presentes en diferentes parásitos helmintos permite identificar estructuras glucídicas que tienen la potencialidad de interactuar con diferentes CLRs (Figura 1.6), aunque muchas de dichas interacciones no han sido comprobadas todavía [26, 81-83]. De hecho, varios trabajos han reportado que la interacción de dichos glicanos con CLRs expresados en células dendríticas llevan a inmunomodular la respuesta inmune del hospedero [26, 81-83].



**Figura 1.6. Los glicanos presentes en helmintos son potenciales ligandos de diferentes lectinas tipo C.** Las células dendríticas inmaduras expresan receptores (CLRs, TLRs), los cuales puede interactuar con e internalizar moléculas de patógenos. Los CLRs son eficientes en la internalización de patógenos y sus productos, y en la presentación en moléculas de MHC. Se han descrito diferentes estructuras glucídicas presentes en helmintos que son potenciales ligandos de CLRs, como DC-SIGN, MR, MGL, como se representa en esta figura. Si bien dicha interacción no ha sido comprobada en todos los casos, sugiere posibles interacciones entre glúcidos parasitarios y CLRs. Adaptado de [26].

En el contexto de una infección por *F. hepatica*, ésto resulta importante ya que se ha determinado que las respuestas de tipo Th1 se asocian a una resistencia contra la infección o protección inmunológica [84]. Por otro lado, las respuestas T reguladoras podrían favorecer la patogenia inducida por este parásito.

A continuación, pasaremos a profundizar en dos CLRs que serán abordados en el transcurso de esta tesis:

### DC-SIGN

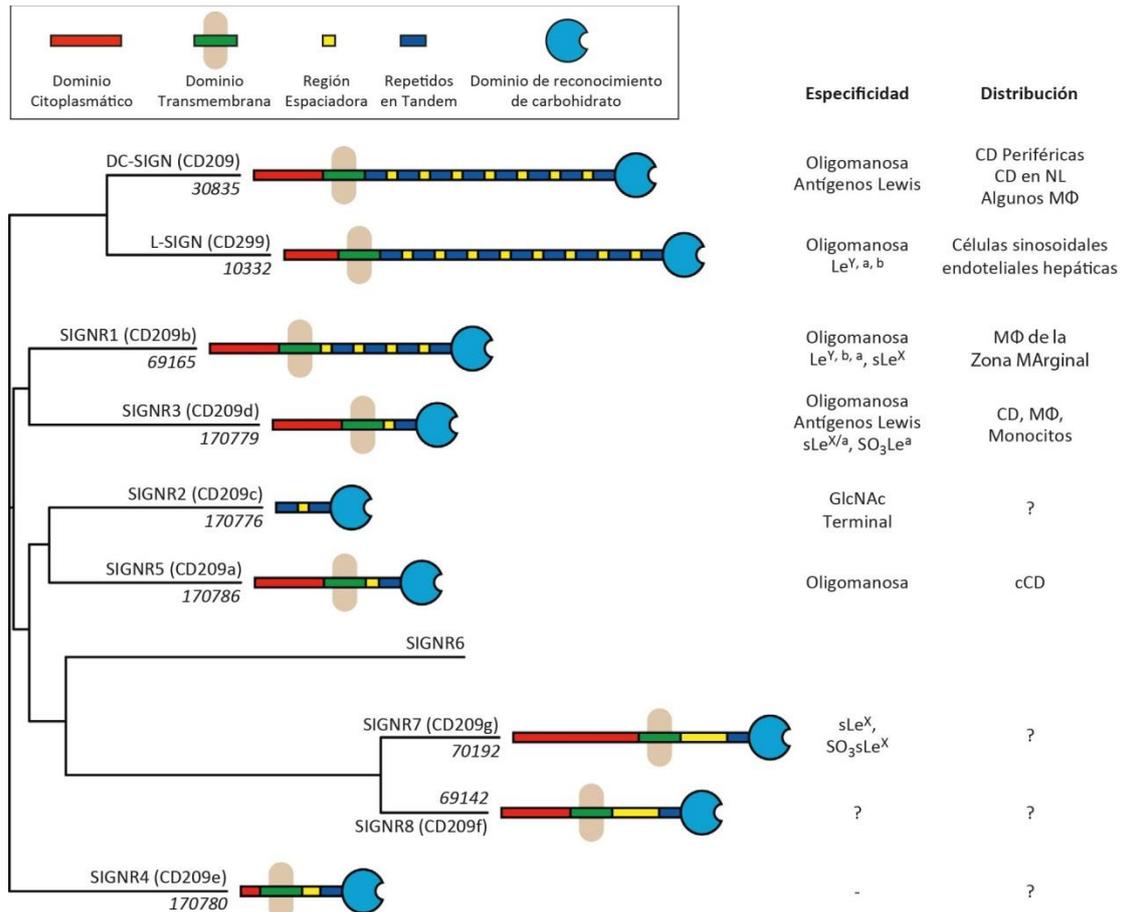
El receptor de ICAM3 no integrina específico de células dendríticas (DC-SIGN, del inglés Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin) es un CLR presente en células mieloides que reconoce y endocita fundamentalmente ligandos manosilados o fucosilados. En particular, reconoce las estructuras fucosiladas de los antígenos de Lewis (particularmente  $Le^x$  y  $Le^y$ ) y N-glicanos con alto contenido en manosa [85, 86].

DC-SIGN ha sido asociado a una gran variedad de procesos biológicos. Es capaz de reconocer una gran variedad de estructuras, tanto ligandos endógenos como ICAM2/3 [87] como derivados de patógenos, desde virus hasta hongos [88], como HIV [89], coronavirus [90], virus del herpes

simple [91], *Helicobacter pylori* [89], *Mycobacterium tuberculosis* [89, 92, 93] o *Candida albicans* [94]. Es incluso capaz de reconocer estructuras glucídicas presentes en tumores [95]. Recientemente, diferentes trabajos han reportado la capacidad de DC-SIGN de interactuar con glicanos derivados de parásitos, modulando de esta forma respuestas inmunes. En efecto, es capaz de reconocer no sólo parásitos protozoarios como *Leishmania* sp. [96], pero también parásitos helmintos como *Schistosoma mansoni* [70, 97, 98] o *Trichuris suis* [82].

La señalización por DC-SIGN ha sido bien estudiada, y se ha visto que este receptor señala por diferentes vías según el tipo de ligando que reconozca, modulando así la señalización desencadenada por TLRs. Cuando DC-SIGN es estimulado por un componente rico en manosa de *Mycobacterium tuberculosis* (ManLam) las proteínas LSP-1, KSR1 y CNK, que se asocian al dominio citosólico de DC-SIGN de forma tirosina-independiente [87], inducen la activación de Raf-1 [87, 89], conduciendo a la fosforilación de la subunidad p65 de NK-kB, la cual es posteriormente acetilada. Dicha acetilación potencia la transcripción de IL-6, IL-10 e IL-12. Sin embargo, cuando DC-SIGN une ligandos fucosilados derivados de *Schistosoma mansoni* o *Helicobacter pylori*, provoca la disociación de KSR1 y CNK dejando asociado solo a LSP-1, y causando un aumento de la transcripción de IL-10 y disminución de IL-6 e IL-12 y favoreciendo de esta forma la inducción de respuestas de tipo Th2, por un mecanismo independiente de Raf-1 [87, 89].

Sin embargo, todos los modelos *in vivo* han fallado en reproducir las funciones fisiológicas de DC-SIGN [85, 86]. Mientras que la familia de DC-SIGN en humanos presenta únicamente dos receptores: DC-SIGN y L-SIGN, en ratón, el panorama es bastante más complejo, encontrándose ocho homólogos de DC-SIGN que se encuentran en una misma región genómico. Éstos difieren en su especificidad, distribución celular y capacidad de internalización, no habiendo un claro homólogo al DC-SIGN humano, lo que dificulta el desarrollo de modelos *in vivo* (Figura 1.7) [85, 86].



**Figura 1.7. Familia de DC-SIGN en humano (DC-SIGN, L-SIGN) y en ratón (SIGNR).** El dendrograma representa una comparación de la secuencia del dominio de reconocimiento de carbohidrato de DC-SIGN y los miembros de familia murina de proteínas relacionadas con DC-SIGN (SIGNR, por su sigla en inglés). Para cada receptor se indica el nombre trivial, el código de cluster de diferenciación (CD) y el código de identificación del gen. Las diferencias estructurales son obvias de las representaciones moleculares y las diferencias en la especificidad de glicano y distribución celular/tisular se muestran al lado de cada molécula. A pesar de la similitud genética entre DC-SIGN y la familia de miembros de la familia SIGNR es aparentemente alta, la divergencia funcional es tal que no puede especificarse un ortólogo funcional murino. Extraído de [85].

### MGL

La lectina de macrófagos específica para Gal/GalNAc (MGL, del inglés Macrophage Galactose Lectin) se expresa en células dendríticas y macrófagos y participa en el reconocimiento e internalización de moléculas endógenas y/o provenientes de patógenos. De esta forma, este receptor es capaz de modificar la respuesta inmune a través de la modulación de las funciones de estas células presentadoras de antígenos, a través de la expresión de moléculas específicas y citoquinas, influyendo o determinando la polarización de células T [99, 100].

Aunque en humanos existe una única variante de MGL (hMGL), en ratones existen dos isoformas: mMGL1 y mMGL2, las cuales poseen diferencias en su especificidad de ligando.

mMGL1 reconoce estructuras complejas como Lewis<sup>x</sup> y Lewis<sup>a</sup>, mientras que mMGL2 reconoce GalNAc en estructuras más simples, como el antígeno Tn (GalNAc-Ser/Thr), TF (Gal-GalNAc-Ser/Thr) y estructuras core 2 [101]. Es esta última la que posee una especificidad similar a la MGL humana [101]. Por último, se ha postulado que ambas isoformas no poseen funciones redundantes ya que reconocen ligandos diferentes y son expresadas por sub-poblaciones de células dendríticas diferentes [100].

Los reportes sobre la inmunomodulación desencadenada por MGL son variados, y abarcan efectos estimuladores, que involucran la potenciación de la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, así como también modulación de la maduración de células dendríticas favoreciendo la producción de citoquinas inmunoreguladoras [102]. A pesar de esta variedad de efectos, que depende del contexto biológico celular y molecular de estudio, es indudable que, a través de la interacción con glúcidos de patógenos, MGL está involucrado en procesos infectivos o inmunoreguladores de patógenos [99, 100].

Un ejemplo en el que se encuentra bien caracterizado el efecto inmunoregulador de MGL en células dendríticas ocurre cuando MGL reconoce el antígeno Tn expresado sobre la molécula de membrana CD45 en células T efectoras humanas. La activación de células T humanas se acompaña de cambios en la glicosilación, conduciendo a la expresión de la estructura Tn [103], cambio que es detectado por MGL en células dendríticas [104]. La interacción MGL-Tn en CD45 en células T efectoras conduce a una disminución de su actividad fosfatasa, reduciendo la proliferación de linfocitos T y la producción de citoquinas inflamatorias, lo que eventualmente conduce a la apoptosis de las células T [103, 104]. Aunque este efecto todavía no se ha reportado en ratones, es interesante notar que los ratones knock-out para mMGL1 poseen mayores niveles de linfocitos T específicos de antígenos circulantes [100].

Asimismo, se ha reportado que MGL podría estar involucrado en la retención de células dendríticas inmaduras, ya que la migración de células dendríticas fue sustancialmente mejorada o favorecida al bloquear MGL con un anticuerpo específico [105]. Además, también se ha comprobado que la estimulación de MGL mediante anticuerpos agonistas, o de ligandos conteniendo el antígeno Tn, induce un aumento en la expresión de IL-10 por parte de células dendríticas MGL<sup>+</sup> [106]. Por último, las células dendríticas MGL<sup>+</sup> condicionadas, tanto *in vitro* como *in vivo*, con ligandos de este receptor, adoptan un programa tolerogénico que dirige la diferenciación de células T a linfocitos supresores Tr1 productores de IL-10, de forma MGL-dependiente [107].

El efecto inmunoregulador de MGL también se ha observado al reconocer moléculas glicosiladas derivadas de patógenos. De hecho, algunos patógenos utilizan este mecanismo como estrategia de evasión inmunitaria, ya que la interacción de *Campilobacter jejuni* con MGL inhibe la maduración de células dendríticas y limita la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 [108]. Por último, mMGL2 se ha visto implicada en la generación o inducción de respuestas celulares Th2, ya sea en un contexto de infección helmíntica, como en una patología alérgica [109, 110].

### ***Herramientas para el análisis glicobiológico***

En el contexto de esta tesis resulta evidente que la elucidación de la composición estructural al igual que la función biológica de los glicanos presentes en glicoconjugados parasitarios es fundamental para comprender el rol que desempeñan los carbohidratos en el proceso infeccioso, al igual que en el desarrollo de la enfermedad.

A pesar de los recientes avances en el área de la glicómica, la caracterización estructural de los glicanos todavía resulta un proceso complejo [111]. A diferencia de los oligonucleótidos y proteínas, las cadenas de glicanos raramente se expresan como polímeros lineales. Los poli y oligosacáridos están compuestos por combinaciones de monosacáridos y monosacáridos modificados con distintas configuraciones anoméricas ( $\alpha$  o  $\beta$ ) que pueden formar diversos enlaces glicosídicos incluyendo ramificaciones en distintos puntos de la cadena oligosacáridica. Por lo cual, la elucidación completa de una secuencia oligosacáridica es difícil de realizar utilizando un único método. Se requiere una combinación de métodos químicos, físicos y fisicoquímicos que aporten información que contribuya a la elucidación completa [111-113]. Una de las primeras estrategias utilizadas con este fin ha sido la deglicosilación química de proteínas. Se ha reportado el uso de hidrazina anhidra para la liberación de N-glicanos y la  $\beta$ -eliminación mediante borohidruro de sodio en medio alcalino suave para la liberación de O- y N-glicósidos [114]. Si bien estos métodos son sumamente útiles para la identificación de estructuras glucídicas, presentan la desventaja de destruir el componente proteico, por lo que no pueden ser utilizados cuando exista interés en estudiar dicho componente. Una alternativa ha sido la utilización del ácido trifluorometanosulfónico en condiciones suaves, permitiendo la hidrólisis de los carbohidratos presentes en las glicoproteínas sin afectar la estructura primaria de las proteínas [115]. Sin embargo, muchas de ellas pueden ser desnaturalizadas en el proceso debido a los solventes utilizados, formando precipitados insolubles que complican su utilización en estudios posteriores.

En este contexto, el uso de glicosidasas específicas es una alternativa interesante a la deglicosilación química ya que éstas permiten liberar los glúcidos sin afectar la estructura tridimensional de las proteínas [115]. Es además una herramienta útil para la identificación de carbohidratos simples presentes en glicoconjugados, al igual que para la elucidación de sus funciones biológicas. El gran problema radica en que la purificación de glicosidasas es costosa y compleja. A su vez luego de la reacción enzimática, la misma debe ser removida del medio de reacción utilizando métodos cromatográficos de forma que no interfiera con los análisis posteriores a ser realizados a la glicoproteína deglicosilada o a los glicanos liberados. Estos inconvenientes se pueden superar inmovilizando las glicosidasas.

### *Estrategias de inmovilización*

Se dice que una enzima está inmovilizada cuando ésta se encuentra recluida en una región definida del espacio, conservando su actividad catalítica. Dentro de las ventajas del uso de enzimas inmovilizadas se encuentran la posibilidad de re-utilizarlas y su fácil separación del medio de reacción sin necesidad de utilizar condiciones drásticas para detener la reacción enzimática. Esto último podría afectar la estructura de las glicoproteínas deglicosiladas. Por otra parte, frecuentemente la inmovilización de una enzima contribuye a un aumento en su estabilidad [116, 117]. Sin embargo, hay muy pocos reportes en la literatura en relación al uso de glicosidasas inmovilizadas aplicadas a la identificación de la naturaleza de los carbohidratos en las glicoproteínas [118, 119].

Los métodos de inmovilización pueden clasificarse en dos grandes grupos: reversibles e irreversibles (Figura 1.8). Los métodos reversibles corren con la ventaja de que permiten la elución de la enzima una vez que la actividad decae por lo que el soporte puede reutilizarse. La inmovilización reversible se da generalmente bajo condiciones suaves [117].

El método más sencillo es la adsorción (interacción no covalente), que se basa en interacciones superficiales reversibles entre la enzima y el soporte (como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, electroestáticas o interacciones hidrofóbicas). Si bien estas fuerzas de enlace se consideran débiles, cuando tienen lugar un alto número de interacciones no covalentes es posible una unión efectiva. En la adsorción física la unión se da a través de puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o interacciones hidrofóbicas. Otro de los métodos de inmovilización reversible es a través de los puentes disulfuro. Aunque se forma un enlace covalente entre la enzima y el soporte, este puede ser escindido por un agente reductor como el ditioneitol (DTT) bajo condiciones suaves [117].

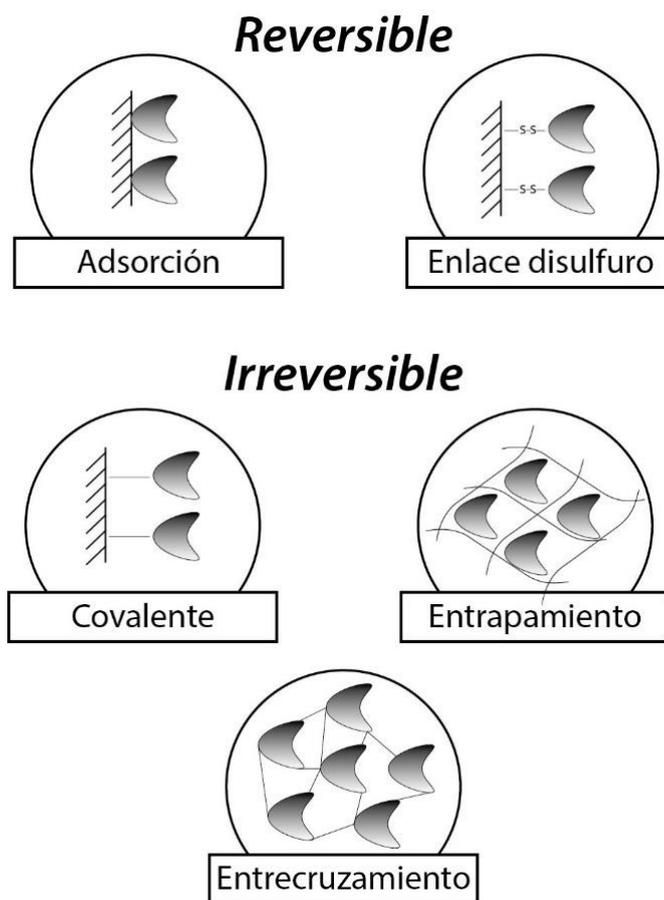


Figura 1.8. Clasificación de métodos de inmovilización enzimática en reversibles e irreversibles.

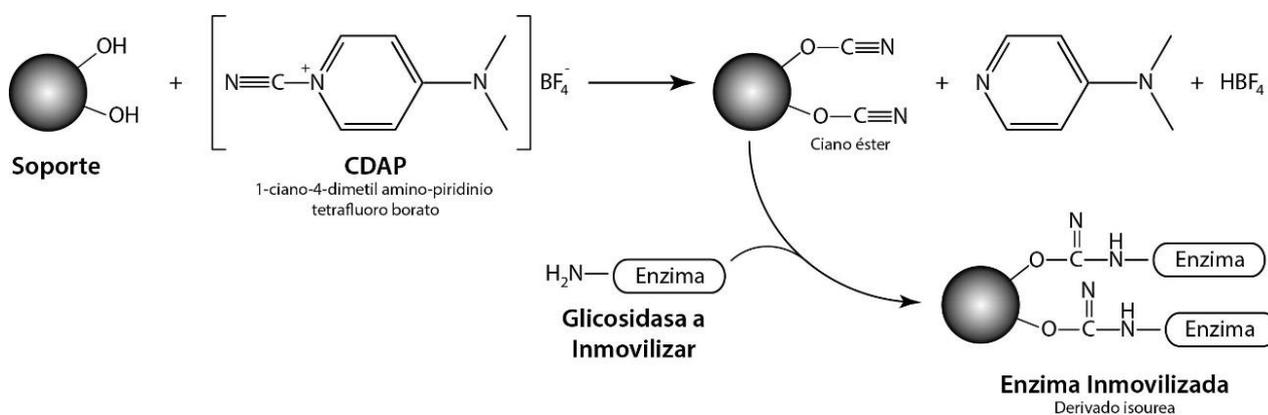
Por otra parte, los métodos de inmovilización irreversibles generalmente se dan por enlaces covalentes con el soporte, por entrecruzamiento y por entrapamiento o inclusión [117]. La inmovilización por unión covalente al soporte es la que se utiliza mayormente y su principal ventaja es que no tiene lugar la liberación de enzima al medio de reacción. El enlace covalente se forma entre los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte y residuos aminoacídicos expuestos en la superficie de la proteína. Es importante que los grupos involucrados en dicha unión no estén involucrados en la actividad catalítica, de forma de evitar una pérdida de actividad [117].

Otro de los métodos irreversibles, es la inmovilización por entrecruzamiento. Este método no utiliza soporte y se basa en la formación de enlaces covalentes entre moléculas de enzima, o en el caso del co-entrecruzamiento, con proteínas inertes como gelatina o albumina sérica bovina por medio de un reactivo bifuncional como el glutaraldehído. A través de éste método sencillo se forma un agregado con alto peso molecular e insoluble, que puede tener la desventaja de que sea gelatinoso y por ende de difícil uso [120].

La inmovilización por entrapamiento es otro método de inmovilización irreversible. Las moléculas de enzimas se encuentran libres pero restringidas por una red polimérica del gel. Se trata de un método no covalente, en el que los poros del gel se encuentran controlados de manera que no haya pérdida enzimática y pueda haber una circulación libre entre sustrato y producto. Este método tiene la ventaja de que las condiciones de entrapamiento son suaves, no afectando la enzima y por lo tanto reduciendo la pérdida de actividad enzimática [117].

*Inmovilización covalente utilizando el método de ciano-4-dimetil-amino-piridinio tetrafluoro borato (CDAP-BF<sub>4</sub>)*

En el presente trabajo se realizó la inmovilización de glicosidasas utilizando el agente cianilante (ciano-4-dimetil amino-piridinio tetrafluoro borato (CDAP-BF<sub>4</sub>), método en el cual nuestro grupo de investigación tiene experiencia [121]. La activación de los grupos hidroxilos de un soporte de tipo polisacárido con CDAP-BF<sub>4</sub> involucra una reacción de cianilación, generando en el soporte estructuras mayoritariamente del tipo cianato ésteres. Éstas reaccionan a continuación con los grupos amino de las proteínas, generando principalmente derivados de tipo isourea (Figura 1.9). Este procedimiento es una modificación de la técnica original de activación descrita para el bromuro de cianógeno (CNBr) [121]. El reactivo es mucho más estable y seguro de manipular en ambientes de laboratorio en comparación con el CNBr, posee menor presión de vapor generando así, mucho menos riesgo para la salud.



**Figura 1.9. Mecanismo de activación de la agarosa por el método CDAP para inmovilización de proteínas.** El proceso de inmovilización consta de dos pasos: la activación del soporte y la inmovilización de las enzimas. La activación de los soportes se realizó mediante la utilización del agente cianilante CDAP, el cual forma grupos ciano éster en los grupos hidroxilos presentes tanto en agarosa como en las nanopartículas. Posteriormente, se llevó a cabo la inmovilización de la enzima, mediante incubación de la misma con el soporte activado, conduciendo a la formación de un derivado isourea entre los grupos amino libres de las enzimas y los grupos ciano éster formados en el paso anterior.

Dos importantes aspectos a tener en cuenta cuando se utilizan enzimas inmovilizadas es el soporte y el peso molecular de los sustratos. Cuando los sustratos son macromoléculas, como en el caso de las glicoproteínas, pueden existir problemas difusionales que limiten el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, reduciendo la eficiencia enzimática. Por ello, es importante la elección del soporte a utilizar, de forma de minimizar este efecto. En este caso el uso de nanosoportes resulta una alternativa interesante. Las nanopartículas magnéticas se caracterizan por su tamaño reducido, lo que sugiere que el comportamiento de la enzima inmovilizada puede asemejarse al de la enzima soluble. A su vez, las propiedades magnéticas del soporte facilitan la separación de la enzima inmovilizada del medio de reacción ya que puede ser realizado sencillamente utilizando un imán [122].

### *Glicosidasas de interés glicobiológico*

Como se mencionó anteriormente, la deglicosilación enzimática de glicoproteínas requiere del uso de endo y exoglicosidasas. Las primeras catalizan la ruptura de enlaces glicosídicos en el interior de la cadena carbohidrata, separando de raíz la cadena oligosacárida de la estructura proteica de una glicoproteína. Por otra parte las exoglicosidasas hidrolizan el enlace glicosídico de residuos terminales, permitiendo la liberación secuencial y específica de los distintos residuos que componen la cadena oligosacárida de una glicoproteína. Teniendo en cuenta la composición de azúcares de las cadenas glicosídicas de la mayoría de las glicoproteínas, las exoglicosidasas más utilizadas son  $\alpha$ -manosidasa,  $\alpha$ -fucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa y sialidasa, que liberan residuos de manosa, fucosa, galactosa y ácido siálico, respectivamente [112].

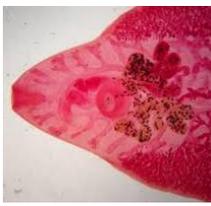
A continuación, se presentan las dos glicosidasas utilizadas en este trabajo:

### *$\beta$ -Galactosidasa*

La  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -D-galactosidogalactohidrolasa, EC 3.2.1.23) se encuentra en plantas, microorganismos y animales, y es de gran interés para la industria alimenticia. La  $\beta$ -galactosidasa cataliza la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -galactósidos, por lo cual podría ser útil para la hidrólisis de residuos terminales de galactosa presentes en N-glicanos híbridos o complejos o en O-glicanos [123, 124]. En esta tesis se utilizó la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus Oryzae*, la cual presenta un peso molecular aparente es de 105.000 Da y un pH óptimo en el entorno de 4,5-4,8. En relación a la estabilidad de la enzima esta reportado que es estable en el intervalo de pH de 4,0 a 9,0. La actividad de  $\beta$ -Galactosidasa es inhibida por varios metales entre ellos cobre y plata [125].

### *$\alpha$ -Manosidasa*

La  $\alpha$ -manosidasa ( $\alpha$ -manosidomanohidrolasa, EC 3.2.1.24) se encuentra en semillas de plantas y tejidos animales. La  $\alpha$ -manosidasa de *Canavalia ensiformis* fue la enzima utilizada en el presente trabajo. La estructura de la misma está compuesta por un tetrámero que contiene dos subunidades con un peso molecular de 66.000 Da y dos subunidades con peso molecular de 44.000 Da [47]. La  $\alpha$ -manosidasa hidroliza unidades de manosa terminales unidas por enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2),  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) y  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6). Su pH óptimo se encuentra entre 4,0 y 4,5. Con respecto a la estabilidad la misma es estable en un rango de pH de 6,0 – 8,5 por al menos 17 horas y mantiene más de un 80% de actividad a pH 6,0 y 4°C por al menos 5 meses [126].



## ***Hipótesis***

Considerando el importante papel que cumplen los glicanos en la biología de los parásitos helmintos y en la evasión inmunológica, la HIPÓTESIS GENERAL de esta tesis es que los glicanos presentes en *F. hepatica* son capaces de modular las células dendríticas a través de su reconocimiento por CLRs, y así contribuir a la generación de respuestas inmunes de tipo Th2 modificada.

## ***Objetivo General***

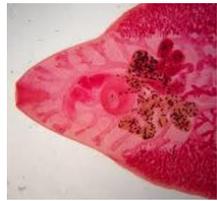
El OBJETIVO GENERAL de esta tesis fue evaluar la capacidad de motivos glucídicos de *F. hepatica* de modular la función de las células dendríticas inmaduras o maduras con ligandos de TLR, al igual que durante la infección parasitaria, intentando caracterizar los glicanos y los receptores involucrados.

## ***Objetivos Específicos***

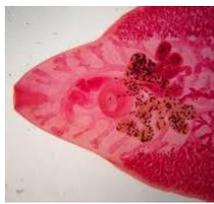
- Evaluar el papel de los glicanos en la regulación de la respuesta inmunológica del hospedero.
- Evaluar el papel inmunomodulador de los glicanos de *F. hepatica* sobre células dendríticas.
- Sintetizar derivados inmovilizados de glicosidasas como herramientas para el estudio del rol biológico de los glicanos.
- Identificar los glicanos parasitarios, focalizándonos en aquellos con actividad inmunomoduladora.
- Identificar los receptores responsables de interactuar con glicanos de *F. hepatica*, que son expresados sobre células dendríticas.



# Capítulo II: Materiales y Métodos







## ***Métodos generales***

### *Ratones*

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

### *Preparación de los lisados de Fasciola hepatica*

Los gusanos adultos de *F. hepatica* fueron obtenidos durante visitas a la playa de faena del Frigorífico Carrasco, recolectados de los ductos biliares de hígados bovinos infectados. Para producir el extracto total, los gusanos adultos fueron lavados en buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4, disgregados mecánicamente en presencia de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) con la ayuda de un homogenizador y posteriormente centrifugado a 40.000 g por 60 min. El sobrenadante fue dializado contra PBS por al menos 48 horas. La concentración proteica del lisado obtenido (FhTE) fue cuantificada utilizando el método del ácido Bicinconínico (BCA) y el mismo se guardó a -80°C. Los niveles de endotoxinas fueron determinados usando el kit Limulus Amebocyte Lysate Pyrochrome (Associates of Cape Cod). Los lisados presentaron niveles de endotoxinas similares al medio de cultivo.

Para la obtención del extracto tegumental, los gusanos adultos fueron incubados en deoxicolato de sodio 1% en glicina 0,15 M pH 9, NaCl 0,5 M por 60 min a 37°C. El sobrenadante fue centrifugado a 20.000 g por 60 min, dializado contra PBS y almacenado a -80°C hasta su uso.

### *Oxidación de FhTE con meta-periodato de sodio*

Los dioles vecinales presentes en los carbohidratos de FhTE fueron oxidados con meta-periodato de sodio (10 mM) en PBS pH 6,5, a temperatura ambiente por 45 min en la oscuridad. Posteriormente, los grupos aldehídos formados fueron reducidos con borhidruro de sodio (50 mM). Finalmente, los lisados fueron dializados contra PBS. El lisado oxidado resultante es

referido como FhmPox. Asimismo, se utilizaron los siguientes controles: FhCB, que consiste en FhTE sometido al mismo tratamiento exceptuando la incubación con periodato de sodio; y CmPox, consistiendo en PBS sujeto a todo el tratamiento.

#### *Ensayo de actividad proteolítica usando caseína como sustrato*

A 550  $\mu\text{L}$  de una solución de caseína 1% en PBS se agregan 50  $\mu\text{L}$  de cada uno de los extractos a una concentración de 3mg/mL. Luego, se incuba a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se detiene la reacción mediante el agregado de 900  $\mu\text{L}$  de TCA 10%. Finalmente, se centrifuga y se mide absorbancia a 280 nm del sobrenadante.

#### *Cuantificación de Proteínas*

La determinación de la concentración de proteínas fue realizada mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) [127]. La reacción se realizó agregándole a 10  $\mu\text{L}$  de la muestra en diferentes diluciones en PBS, 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción, siendo la composición de la misma el reactivo BCA (Sigma Aldrich, US) y sulfato de cobre, en una relación de partes 50:1. Posteriormente se incubó 1 hora a 37°C, para luego medir la absorbancia a 570 nm la formación del complejo.

Alternativamente, se utilizó el método de Bradford cuando la existencia de glicanos libres pudieran afectar el método del BCA. Para ello, 30  $\mu\text{L}$  de la muestra en diferentes diluciones en PBS fueron incubados con 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó la medida de la absorbancia a 570 nm.

#### *Evaluación del reconocimiento de FhTE por Lectinas*

Ensayos tipo ELISA (por su sigla en inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) fueron llevados a cabo para evaluar el reconocimiento de FhTE por parte de lectinas. Para ello, placas de ELISA Nunc Maxisorp (Roskilde, Dinamarca) fueron sensibilizadas con FhTE (2-5  $\mu\text{g}$  por pocillo) en Buffer carbonato 50 mM pH 9,6 durante 18 horas a 4°C. Luego de realizar 3 lavados con buffer Tris 20 mM, NaCl 150 mM, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 2mM  $\text{MgCl}_2$  pH 7,4 (TSM) conteniendo Tween 20 0,1%, se procedió a bloquear la placa con seroalbúmina bovina (BSA) 1% en TSM durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TSM/Tween 20 0,1%, para luego agregar diferentes lectinas o proteínas quiméricas.

En el caso de la utilización de lectinas vegetales comerciales, las placas se incubaron con diferentes concentraciones de lectinas biotiniladas (10, 1 y 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 1 hora a 37°C. Para los ensayos de inhibición, las lectinas fueron pre-incubadas por 30 min a 37°C con 50 mM

de los monosacáridos indicados. A continuación, se realizaron 3 lavados con TSM/Tween-20 0,1%, para luego incubar con estreptavidina conjugada a DyLight 800 durante 30 min a 37°C. El revelado se realizó a través de un sistema de imagen infrarrojo Odyssey (LI-COR, NE, US). En el presente trabajo se utilizaron las lectinas provenientes de: *Vicia Villosa* isolectina B<sub>4</sub> (VVL: GalNAc, Antígeno Tn), *Triticum vulgare* (WGA: GlcNAc), *Canavalina ensiformis* (ConA:  $\alpha$ Man $\rightarrow$  $\alpha$ Glc), *Arachis hipogaea* (PNA:  $\beta$ Gal(1 $\rightarrow$ 3)GalNAc, Antígeno T), *Ulex europaeus* (UEA:  $\alpha$ Fuc), *Erythrina cristagalli* (ECA:  $\beta$ Gal(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc), *Sambucus Nigra* (SNA:  $\alpha$ NeuAc) y *Helix Pomatia* (HPA: GalNAc).

Además de las lectinas vegetales, se utilizaron proteínas quiméricas recombinantes disponibles en el laboratorio de la Dra. van Kooyk, las cuales consisten en el dominio de reconocimiento de carbohidrato (DRC) de diferentes CLRs, fusionado a la porción constante de una inmunoglobulina humana (CLR-hFc) [86, 128, 129]. De esta forma se puede utilizar un ensayo tipo ELISA para determinar la interacción entre diversos CLRs con FhTE. Para ello, placas de ELISA sensibilizadas fueron incubadas 10  $\mu$ g/mL de cada CLR-hFc durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron lavados con TSM/Tween-20 0,1%, para luego detectar la presencia de proteínas quiméricas adheridas a la placa mediante la incubación con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas humanas conjugado a peroxidasa. Finalmente, se procedió al revelado con una solución de sustrato tetrametilbenzidina (TMB) y 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en Buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 5. Las proteínas quiméricas utilizadas en el presente trabajo presentaban DRC de los siguientes CLRs humanos: hMGL, DC-SIGN, MR, Dectin-1a y Langerina.

La necesidad de la presencia del ión Ca<sup>2+</sup> para la interacción, se verificó mediante el agregado del agente quelante EGTA. Asimismo, cuando se indique, la especificidad de unión fue verificada a través de ensayos de inhibición utilizando estructuras glucídicas (GalNAc 50 mM para hMGL-hFc; Manano 10  $\mu$ g/mL para DC-SIGN-hFc) o 10  $\mu$ g/mL de anticuerpos bloqueantes (1G6.6 y AZN-D1, respectivamente), los cuales fueron pre incubados con los CLR-hFc durante 30 min a 37°C antes ser agregados a la placa. Alternativamente, FhTE se trató con las enzimas  $\alpha$ -N-Acetilgalactosaminidasa,  $\alpha$ -Manosidasa y  $\alpha$ -Fucosidasa (Prozyme, CA, US), de forma soluble según las indicaciones del proveedor, como forma de analizar los glicanos de FhTE involucrados en la unión a CLRs. Finalmente, se realizaron ensayos de inhibición para determinar los ligandos a través de los cuales se une hMGL-hFc a FhTE. Estos consistieron en pre-incubar las placas sensibilizadas con FhTE y bloqueadas con BSA 1%, con 10  $\mu$ g/mL de las lectinas VVL y ConA o con anticuerpos específicos contra estructuras glucídicas: 83D4 (específico para el Antígeno Tn),

259-2A1 (GalNAc Terminal), 273-2F2 (LDN, Di N-Acetil Lactosa), P12 (Lewis<sup>x</sup>) y SMFG4.1 (LDNF, Fucosil Di N-Acetil Lactosa).

### *Western Blot*

Para la evaluación de la reactividad de anticuerpos o lectinas en las diversas proteínas de los extractos parasitarios, se llevó a cabo ensayos de western blot. Las proteínas en los lisados parasitarios fueron separadas en geles de poliacrilamida 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y reductoras, para luego ser transferidos a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Sclay, Francia) a 45 V durante 16-24 horas en buffer Tris-HCl 20mM pH 8,3, Glicina 192 mM y Etanol 10%.

Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4°C con BSA 1% en PBS. Luego se hicieron 3 lavados con PBS / Tween 0.1% durante 10 minutos. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos anti-Tn (mAb 83D4), anti-FhCL1 (anticuerpo policlonal específico para la Catepsina L1 de *F. hepatica*, gentilmente provisto por la Dra. Patricia Berasain), las lectinas HPA o VVL, o las proteínas quiméricas hMGL-, mMGL1 y mMGL2-hFc, siendo estas últimas las que presentan los DRC de los homólogos murinos de MGL. Previo a la incubación con las lectinas HPA y VVL, se bloqueó el contenido de biotina/estreptavidina endógeno mediante la utilización de un kit correspondiente (Vector Labs). Luego de los correspondientes lavados, se realizó una incubación con estreptavidina o anticuerpos anti-ratón o anti-humano conjugados a peroxidasa, según correspondiera. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia (Amersham, Sclay, Francia).

### *PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)*

El RNA total fue purificado utilizando Tri-reagent (Sigma-Aldrich). La PCR en tiempo real fue realizada usando el método de SYBR Green utilizando un sistema de detección ABI 7900HT, como se describe previamente [130].

### *Citometría de flujo*

Las células a ser analizadas por citometría de flujo fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS conteniendo suero fetal bovino (SFB) 2% y azida de sodio 0,1% (PBS/SFB). Para la tinción de moléculas de superficie, las células se incubaron durante 30 min a 4°C con los anticuerpos

monoclonales (o sus controles de isotipo) conjugados a sus respectivos fluorocromos. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS/SFB y se resuspendieron en PBS hasta su análisis.

Con el fin de estudiar la expresión de moléculas intracelulares, las células se fijaron y permeabilizaron durante 20 minutos a 4°C en solución Cytotfix/Cytoperm de acuerdo a las instrucciones del proveedor (BD Biosciences) y la tinción intracelular se incubó con los anticuerpos correspondientes o el control de isotipo durante 30 minutos a 4°C. Por último, las células se lavaron con PBS/SFB dos veces y se resuspendieron en PBS/paraformaldehído 1%.

Las poblaciones celulares fueron analizadas utilizando citómetros de flujo BD FACScalibur (BD Biosciences) o Cyan (Dako).

Salvo el anticuerpo 1G6.6 (producido en el laboratorio de la Dra. van Kooyk), los anticuerpos fueron obtenidos de Affymetrix (CA, USA), de BD-Biosciences (CA, USA) o Biolegend (CA, USA). A continuación, se indican los anticuerpos utilizados en el transcurso de la presente tesis:

**Tabla 2.1. Anticuerpos específicos contra diferentes proteínas humanas y murinas utilizados en la presente tesis.**

Anti-moléculas murinas		Anti-moléculas humanas	
Especificidad	Clon	Especificidad	Clon
CD3	17A2	CD40	5C3
CD4	RM4-5	CD80	L307.4
CD8	53-6.7	CD86	BU63
CD11c	N418	DC-SIGN	120507
CD25	PC61.5	HLA-DR	G46-6
CD40	HM40-3	IL-4	3010.211
CD68	FA-11	IFN $\gamma$	25723.11
CD80	16-10A1	MGL	1G6.6
CD86	GL1	OX40L	IK-1
F4/80	BM8		
FoxP3	FJK-16s		
I-A/I-E	2G9		
IL-10	JES5-16E3		
IL-12/23p40	C15.6		
Ly6C	HK1.4		
Ly6G	1A8		
mMGL1	LOM-8.7		
mMGL2	URA-1		
Siglec-F	1RNM44N		
SIRP $\alpha$	P84		

### *Análisis estadístico*

Los resultados fueron analizados utilizando el test de t de Student o el test ANOVA de una vía seguido del test de múltiple comparación de Bonferroni utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Los resultados fueron considerados significativamente diferente cuando  $p < 0,05$ .

### ***Modelo murino de Infección por F. hepatica***

Grupos de 5 ratones BALB/c fueron infectados oralmente con 10 metacercarias de *F. hepatica* (Baldwin Aquatics, USA). Luego de tres semanas de infección, se obtuvo el suero, las células del exudado peritoneal (PECs, por su sigla en inglés *Peritoneal exudates cells*), bazos, hígados y ganglios linfáticos hepáticos. Los PECs fueron obtenidos mediante lavado de la cavidad peritoneal con 5 mL de PBS previamente enfriado. Las infecciones también fueron realizadas con 5, 10 y 15 metacercarias por ratón, y utilizando diferentes tiempos de infección: 1, 2 o 3 semanas.

### *Evaluación del daño hepático*

El daño hepático se evaluó mediante tres formas diferentes. La actividad alanin transaminasa fue determinada en sueros de animales infectados y no infectados utilizando un kit comercial (Spinreact, España), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La presencia de gusanos en los hígados infectados fue analizada para calcular la carga parasitaria. Finalmente, los hígados fueron fijados en para-formaldehído 4% y posteriormente incluidos en parafina. Se realizó el análisis histológico de los mismos mediante la tinción de cortes con hematoxilina y eosina, lo cual permite identificar la existencia de disrupción del tejido, necrosis, infiltrado inflamatorio y, en algunos casos, también gusanos.

### *Estudio de la respuesta inmune celular*

Para el estudio de la polarización de linfocitos durante la infección, se obtuvieron suspensiones celulares de bazo (esplenocitos) y de los ganglios linfáticos hepáticos. Esplenocitos y células de ganglios linfáticos ( $1 \times 10^6$ ) fueron cultivados en RPMI completo (Roswell Park Memorial Institute 1640, conteniendo L-glutamina (2.05 mM), SFB 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0,1 mg/mL y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,05 mM), en presencia de diferentes lisados parasitarios (FhTE, FhCB, FhmPox; 75  $\mu$ g/mL) o Concanavalina A (ConA; 5  $\mu$ g/mL) por 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Luego de ese tiempo, se determinó la concentración de las citoquinas IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo o por qRT-PCR.

Alternativamente, los esplenocitos ( $5 \times 10^5$ ) o linfocitos T CD4 $^+$  ( $2 \times 10^5$ ) purificados de bazo, fueron estimulados mediante el co-cultivo con células dendríticas murinas ( $5 \times 10^4$ ), las cuales fueron previamente cargadas con los diferentes lisados parasitarios (75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 16 horas a 37°C y 5% CO $_2$ .

### *Estudio de la respuesta inmune humoral*

La reactividad de anticuerpos policlonales de animales infectados y no infectados fue evaluada por ELISA. Brevemente, placas de ELISA (Nunc, Roskilde, Dinamarca) fueron sensibilizadas con FhTE (2  $\mu\text{g}$  por pocillo) en buffer carbonato 50 mM pH 9,6. Luego de bloquear con BSA 1% en PBS durante 1 hora a 37°C, se realizaron varios lavados con PBS/Tween 20 0,1%. Posteriormente, diferentes diluciones del suero de ratones infectados y no infectados fueron agregadas a los respectivos pocillos, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. La detección de los anticuerpos fue realizada con un anti-inmunoglobulina de ratón conjugado a peroxidasa, en que se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se procedió al revelado con una solución de sustrato o-fenilendiamina (OPD) 0,5 mg/mL y 0,12% de H $_2$ O $_2$  en Buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 5. La reacción se detuvo por agregado de ácido sulfúrico 12,5%, para luego realizar la lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS, Finlandia).

Para evaluar la presencia de anticuerpos contra estructuras glucídicas, se realizó la oxidación las mismas utilizando meta-periodato de sodio previo al agregado de las diluciones de los sueros. Para ello, luego de la sensibilización con FhTE, las placas fueron incubadas durante 30 min y en oscuridad con meta-periodato de sodio 10mM en buffer acetato de sodio pH 4,5. Una vez transcurrido ese tiempo, se realizaron lavados con el mismo buffer, para luego incubar con glicina 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Como controles (Fhmock), los pocillos fueron tratados de la misma manera, en ausencia de meta-periodato de sodio.

### ***Cultivo Celular***

#### *Determinación de ligandos de TLR en FhTE*

Para la determinación del contenido de ligandos de TLR2 y TLR4 en FhTE, se utilizaron células modificadas genéticamente HEK293-TLR2 y HEK293-TLR4-MD2, respectivamente. Las mismas fueron cultivadas en medio RPMI completo suplementado con 1 mg/mL de G418 (Invitrogen).

Un total de  $10^5$  células por pocillo fueron estimuladas con diferentes concentraciones de FhTE. Como control positivo se utilizaron diferentes concentraciones de Pam3CSK4 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o LPS (20  $\text{ng}/\text{mL}$  a 1  $\text{ng}/\text{mL}$ ). Posteriormente, el contenido de IL-8 fue analizado en los sobrenadantes de cultivo.

### *Células dendríticas*

#### - *Células dendríticas murinas*

Las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC, por su sigla en inglés *Bone Marrow Derived Dendritic Cells*) fueron generadas a partir de los precursores de la médula ósea de fémures y tibias de ratones BALB/c. Se cortaron las extremidades de los huesos y haciendo uso de una jeringa de 1 mL se extrajeron las células progenitoras en medio RPMI completo. Las mismas se contaron y se llevaron a una dilución de  $2,0 \times 10^5$  células/mL en medio RPMI completo y sobrenadante de cultivo de células J558 transfectadas con Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF, por su sigla en inglés *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*). Una vez llevadas a la concentración deseada, las células precursoras de células dendríticas se depositaron en placas de petri a razón de 10 mL por placa. Al tercer día se observaron las células y en caso de presentar islotes se adicionaron 5 mL de medio RPMI completo con 0,5% GM-SCF. Del día 7 a 9 las células en suspensión se colectaron y se analizó la expresión de CD11c.

Para el análisis de la maduración de células dendríticas, las BMDCs ( $2 \times 10^5$  células por pocillo) fueron incubadas con los lisados parasitarios a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$  en placas de 96 pocillos, en presencia o ausencia de LPS (*Escherichia coli* O111:B4, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 16 horas. Las células fueron centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min a  $4^\circ\text{C}$  y los sobrenadantes fueron colectados para la evaluación de los niveles de citoquinas. Alternativamente, las células fueron preincubadas por 45 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con 10 mM de diferentes monosacáridos o 10  $\mu\text{M}$  de inhibidores específicos de señalización celular (PHPS1, inhibidor de SHP2; GW5074, inhibidor de Raf-1; ER27319, inhibidor de Syk).

El análisis de la viabilidad celular luego de la incubación con los diferentes extractos parasitarios se realizó utilizando el ensayo de MTT (bromuro de 2-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-3,5-difenil-2H-tetrazolio). Para ello, las BMDCs fueron incubadas durante 4 horas con MTT, para posteriormente disolver los cristales formados utilizando 40 mM HCl en Isopropanol y realizar la lectura de la abosrbancia a 570 nm.

- *Células dendríticas humanas*

Para la obtención de células dendríticas, monocitos fueron purificados a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de la fase leuco-plaquetaria (buffy coats) de donantes sanos (Sanquin, Países Bajos) utilizando primero un gradiente de ficoll (Axis-Shield, San Diego, CA) y una posterior centrifugación en gradiente de percoll (GE Healthcare Life Science, Países Bajos). Las células dendríticas fueron generadas cultivando monocitos purificados en RPMI completo suplementado con IL-4 (262,5 U/mL; Biosource, Bélgica) y GM-CSF (112,5 U/mL; Biosource, Bélgica) por 4 a 7 días.

Los ensayos de maduración consistieron en estimular células dendríticas humanas ( $2 \times 10^5$  células por pocillo) durante 16 horas a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub> con los lisados parasitarios (ya sea de forma soluble como inmovilizado sobre una placa de ELISA) en presencia o ausencia de los ligandos de TLR LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, 10 ng/mL) o PAM3CSK4 (10 µg/mL). En determinadas ocasiones, las células dendríticas fueron pre incubadas durante 60 min a 37°C con diferentes anticuerpos bloqueantes de CLRs: anti-DC-SIGN (AZD-N1), anti-DCIR (111F8.04), anti-MR (19.2) o anti-MGL (1G6.6), o los respectivos controles isotípicos (IgG1 murino para AZD-N1, 111F8.04 y 19.2; IgG2b murino para 1G6.6).

*Ensayo de inducción de linfocitos T reguladores/anergia*

Se purificaron linfocitos T naive (CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>) a partir de PBMC de donantes utilizando MACS beads MACS beads (Milteny). Posteriormente, fueron cultivados con células dendríticas alogénicas, estimuladas como se indica anteriormente en un relación 1:10 ( $1 \times 10^4$  células dendríticas y  $1 \times 10^5$  linfocitos T naive). Luego de 6 días, los linfocitos T fueron lavados y se dejaron descansar durante 3 días en presencia de IL-7 e IL-15 (ImmunoTools). Una vez transcurrido ese tiempo, los linfocitos T fueron lavados y re estimulados mediante co-cultivo con células dendríticas del donante original (relación 1:10), previamente activadas con LPS por 16 horas. Luego de 6 días de esta segunda estimulación, se administró [<sup>3</sup>H] Timidina (1 µCi por pocillo; GE Healthcare) y se incubó por 18 horas. La incorporación de [<sup>3</sup>H] Timidna fue evaluada con un contador de centello líquido Betaplate 1205 (Wallac-LKB).

*Ensayo de polarización de linfocitos T vírgenes*

Las células dendríticas humanas fueron estimuladas durante 48 horas como se describe en la sección correspondiente. Transcurrido ese tiempo, la expresión de moléculas co-estimuladoras fue determinada mediante citometría de flujo. Luego de la estimulación, las células fueron

lavadas y co-cultivadas con linfocitos T naive alogénicos (CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>, relación 1:10) purificadas utilizando MACS beads (Milteny), en presencia de la enterotoxina estafilococcica B (10 pg/mL, Sigma Aldrich). En el día 5 luego del co cultivo, se tomaron los sobrenadantes (para evaluación de IFN $\gamma$ ) y reemplazados por medio suplementado con rhIL-2 100 U/mL (Immunotools). Luego de una semana, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron estimulados con un cocktail conteniendo forbol-12-miristato-13-acetato 100 ng/mL, ionomicina 1  $\mu$ g/mL, y Brefeldina A 10  $\mu$ g/mL por 5-6 horas. Pasado ese tiempo, se analizó la expresión de IL-4 e IFN $\gamma$  por citometría de flujo, como se describió anteriormente para la evaluación de proteínas intracelulares.

### *Ensayos de internalización*

La internalización y unión de FhTE a células dendríticas fue analizada por citometría de flujo, utilizando lisado parasitario previamente conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 633 o Alexa Fluor 647 según indicaciones del fabricante (Sigma Aldrich). Se incubaron 1x10<sup>5</sup> células dendríticas (murinas o humanas) con AF-FhTE por 1 hora a 37°C en medio completo (para analizar la internalización) a 4°C (para analizar la unión). En determinadas ocasiones, las células dendríticas fueron pre incubadas por 45 min a 37°C con 10  $\mu$ g/mL de anticuerpos bloqueantes o con 50 mM de monosacáridos, previo a la adición de AF-FhTE.

La ruta intracelular seguida por FhTE en células dendríticas humanas luego de su internalización fue analizada por citometría de flujo con análisis de imagen utilizando el equipo ImageStreamX (Amnis Corp), como ha sido previamente descrito [131]. moDCs fueron incubadas con ATTO633-FhTE a diferentes tiempos (15, 30 o 60 minutos) a 37°C, luego del cual se fijaron con p-formaldehído 4%, permeabilizaron con saponina 0,1%, tiñeron con anticuerpos monoclonales específicos para LAMP-1 o EEA-1, o policlonal específico para la porción C terminal de DC-SIGN (CSRD) y finalmente, se analizaron por citometría con análisis de imágenes. Datos basados en al menos 10.000 células. Un mínimo de 15.000 células fueron adquiridas por muestra, con un flujo de entre 50 y 100 células por segundo.

### *Determinación de citoquinas*

Los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo fueron cuantificados mediante ensayos de ELISA sándwich específicos (BD Bioscience, para citoquinas murinas; Biosource para citoquinas humanas). Para ello, placas Nunc de 96 pocillos fueron sensibilizadas con anticuerpos primarios específicos de cada citoquina (BD Bioscience) en buffer carbonato 50 mM pH 9,6 toda la noche a 4°C. Se bloqueó con BSA 1% en PBS por 1 hora a 37°C.

Para las citoquinas murinas, se utilizaron diferentes diluciones de los sobrenadantes, así como los estándares de cada citoquina para las curvas de calibración, que se incubaron por 1 hora a 37° C. Los anticuerpos secundarios conjugados a biotina utilizados se incubaron durante 45 minutos a 37°C. La estreptavidina-peroxidasa fue incubada por 30 minutos a 37°C. El sistema de revelado consistió en OPD 0,5 mg/mL y 0,12% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en Buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 5, como indicado anteriormente.

Para las citoquinas humanas, diferentes diluciones de sobrenadantes a evaluar y los estándares fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente en presencia del anticuerpo secundario conjugado a biotina. Posteriormente, se agregó la estreptavidina conjugada a peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió al revelado con una solución de sustrato tetrametilbenzidina (TMB) y 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en Buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 5. En ambos casos, la reacción se detuvo por agregado de ácido sulfúrico 12,5%, para luego realizar la lectura de la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA.

### ***Métodos utilizados en la inmovilización de glicosidasas***

#### *Preparación del extracto enzimático de β-Gal*

Se incubó 1 g de enzima β-Galactosidasade *Aspergillus Oryzae* (Sigma-Aldrich G5160) con 7,5 mL de buffer de actividad (Acetato de sodio 50 mM, pH 5,5) bajo agitación magnética durante 30 minutos. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y 10.000 rpm. El extracto enzimático se guardó a 4°C. Previo a su utilización, la enzima fue gel-filtrada utilizando columnas PD-10 (Sephadex G-25).

#### *Ensayo de actividad enzimática para la β-Gal*

La actividad enzimática de la β-Galactosidasasa se determinó utilizando el sustrato cromogénico o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG, Sigma-Aldrich). Se incubaron 100 μL de una dilución de enzima con 2 mL de ONPG 25 mM preparado en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,5 (buffer de actividad de β-galactosidasa) a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia del producto formado a una longitud de onda de 405 nm. El coeficiente de extinción para el ONP a pH 5,5 es de  $7,5 \times 10^2 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

Para medir la actividad de la enzima inmovilizada se preparó una suspensión estándar (10% p/v en buffer de actividad). El ensayo para evaluar la actividad de derivados inmovilizados sobre agarosa se realizó en las mismas condiciones descritas para enzima soluble, utilizando un

espectrofotómetro equipado con agitación magnética. La actividad de la enzima inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas fue evaluada mediante la incubación de 50  $\mu\text{L}$  de una suspensión estándar con 1 mL de ONPG 25 mM buffer de actividad a temperatura ambiente. Se extrajeron alícuotas 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción cada 30 segundos y durante 3 minutos, con la ayuda de un imán para retirar la enzima inmovilizada. El sobrenadante fue añadido a 100  $\mu\text{L}$  de buffer borato de sodio 0,2 M pH 9,8 en una placa de ELISA y la absorbancia fue determinada a 405 nm. La concentración de ONP fue determinada usando una curva de calibración.

Una unidad de enzima (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ONP por minuto a temperatura ambiente y pH 5.5. La actividad enzimática fue expresada como U/mL para la enzima soluble y U/g de soporte. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

#### *Ensayo de actividad enzimática para la $\alpha$ -Manosidasa*

Para el ensayo de actividad de la  $\alpha$ -Manosidasa se utilizó como sustrato, el p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido (PNPM). Se incubaron 70  $\mu\text{L}$  de una dilución adecuada de enzima con 630  $\mu\text{L}$  de PNPM 5 mM en buffer citrato de sodio 50 mM pH 4,5 suplementado con 0,1 mM de acetato de zinc (buffer de actividad de  $\alpha$ -manosidasa). Se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  cada 30 segundos, y se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de buffer borato de sodio 0,2 M pH 9,8 para detener la reacción enzimática. Se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  a una microplaca y se midió absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA. Se determinó la concentración de PNP utilizando una curva de calibración.

Para medir la actividad de la enzima inmovilizada se preparó una suspensión estándar (10 % p/v en buffer de actividad). El ensayo de actividad se realizó en las mismas condiciones que para la enzima en solución, tanto para los derivados inmovilizados en agarosa como en nanopartículas. La remoción del derivado enzimático se realizó por decantación (agarosa) o mediante la utilización de un imán (nanopartículas magnéticas).

La unidad de enzima (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de PNP por minuto a pH 4.5 y temperatura ambiente. La actividad enzimática fue expresada como U/mL para la enzima soluble y U/g de soporte. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

### *Inmovilización de enzimas*

La inmovilización de glicosidasas se llevó a cabo en dos tipos de soportes: agarosa y nanopartículas de sílica magnéticas.

#### *- Activación de agarosa*

El gel agarosa 4B, se activó utilizando el agente cianilante ciano-4-dimetil-amino-piridinio tetrafluoro borato (CDAP-BF<sub>4</sub>) de forma de introducir grupos cianato éster [121]. Todos los reactivos utilizados fueron pre-enfriados a 4°C. Se lavaron 3 g de agarosa 4B con: 50 mL de agua destilada, 50 mL de acetona:agua (3:7) y 50 mL de acetona:agua (6:4). Se escurrió el gel haciendo vacío, se suspendió en 2 mL de acetona:agua (6:4) y se colocó en baño de hielo. Posteriormente, se agregaron a la suspensión de gel 2 mL de CDAP 160 mM en acetona:agua (6:4) bajo agitación vigorosa durante 3 minutos. A continuación, se agregaron 240 µL de una solución de trietilamina (TEA) 0,2 M gota a gota durante un periodo de 2 a 3 minutos. Después de 3 minutos de agitación continua, se transfirió rápidamente la mezcla de reacción a un recipiente conteniendo 50 mL de HCl 50 mM enfriado a 4°C. Luego de un máximo de dos minutos el gel se lavó rápidamente en una placa filtrante con 50 mL de agua a 4°C y se utilizó en forma inmediata para la inmovilización de la enzima correspondiente.

#### *- Activación de nanopartículas*

El procedimiento fue optimizado en nuestro laboratorio. Todos los reactivos utilizados fueron pre-enfriados a 4°C. 30 mg de nanopartículas magnética (SIMAG-Hydroxyl) fueron lavados con 5 mL de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4, 5 mL de acetona:agua (3:7) y 5 mL de acetona:agua (6:4). La remoción del sobrenadante en las diferentes etapas fue realizada mediante la utilización de un imán. Luego de los diferentes lavados, las nanopartículas fueron resuspendidas en 300 µL de acetona:agua (6:4), para posteriormente agregar 1 mL de una solución de CDAP 160 mM en acetona:agua (6:4) e incubar durante 3 min a 4°C bajo agitación vigorosa. Inmediatamente después, 180 µL de TEA 0,2 M fueron agregados gota a gota durante un lapso de 2 minutos. A continuación, se removió el sobrenadante y se agregaron 1 mL de HCl 50 mM enfriado a 4°C. Luego de no más de 2 min, el sobrenadante fue removido y las nanopartículas fueron lavadas con 50 mL de agua 4°C y utilizadas de forma inmediata para la inmovilización de las enzimas de interés.

- *Inmovilización de la  $\beta$ -Galactosidasa*

1,5 g de agarosa activada o 10 mg de nanopartículas activadas se incubaron con 15 mL (37 U/mL) o 0.4 mL (19-76 U/mL) de  $\beta$ -Galactosidasa respectivamente, en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8,3 (buffer de inmovilización), durante 4 horas a temperatura ambiente y agitación suave en roto-torque. Se separó el sobrenadante, se lavó el derivado inmovilizado con buffer de actividad y se guardó a 4°C.

- *Inmovilización de la  $\alpha$ -Manosidasa*

0,3 g de agarosa activada o 10 mg de nanopartículas activadas se incubaron con 2 mL (12.6 U/mL) o 0.4 mL (2,6 - 11 U/mL) de  $\alpha$ -Manosidasa (Sigma Aldrich) en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,5 suplementado con 0,1 mM de acetato de zinc (buffer de inmovilización) durante 4 horas a temperatura ambiente y agitación suave en roto-torque. Se separó el sobrenadante, se lavó el derivado inmovilizado con buffer de inmovilización y se guardó a 4°C.

- *Cuantificación de proteínas de proteínas inmovilizadas*

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica del BCA. La cuantificación de la  $\beta$ -Galactosidasa inmovilizada sobre agarosa, se realizó utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente para determinación de proteínas solubles, pero incubando 50  $\mu$ L de suspensión estándar con 1 mL de reactivo a 60°C durante 15 minutos bajo agitación. Para el caso de la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada sobre nanopartículas y la  $\alpha$ -Manosidasa inmovilizada en ambos soportes, la cantidad de enzima inmovilizada se determinó por diferencia entre la proteína aplicada y la recuperada en el sobrenadante. Los resultados se expresaron en mg/mL para la enzima soluble y mg/g para los derivados inmovilizados.

*Deglicosilación de proteínas modelo*

- *Degalactosilación de asialofetulina*

La asialofetulina se obtuvo mediante la desialilación química de fetuina de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich). Se disolvieron 30 mg de fetuina en 2,55 mL de HCl 0,2 N, y se incubaron en un termo block a 80°C durante una hora. Se enfrió en baño de agua a temperatura ambiente y se neutralizó con NaOH 2,0 N. Luego se dializó durante 24 horas contra buffer acetato de amonio 50 mM, pH 5,5. Se centrifugó el producto de diálisis durante 5 minutos a 10.000 rpm y se midió el pH para verificar la efectividad de la diálisis.

La degalactosilación de la asialofetuina (6 mg/ml) se realizó mediante la incubación 2 mL o 1 mL de solución proteica con 100 mg o 10 mg de  $\beta$ -Galactosidasa inmovilizada sobre agarosa o sobre nanopartículas, respectivamente, durante 24 horas bajo agitación suave en roto-torque a temperatura ambiente. Se separó el derivado por filtración (agarosa) o utilizando un imán (nanopartículas), los que se lavaron con buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,5 y se conservaron a 4°C para volver a utilizar. El sobrenadante se gel-filtró en columnas de Sephadex G-25 PD-10 equilibrada en buffer acetato de amonio 50 mM, pH 5,5 para separar la asialofetuína degalactosilada de la galactosa liberada. Se sembraron 2,0 mL de asialofetuina degalactosilada, se eluyó con el buffer acetato de amonio 50 mM pH 5,5, y se recogieron las siguientes fracciones; i) la fracción donde eluye la asialofetuina degalactosilada (volúmenes entre 2,5 y 5,5 mL), la que se guardó para realizar estudios de reconocimiento con lectinas, mediante un ensayo tipo ELISA ya descrito para FhTE y ii) Una segunda fracción (volúmenes entre 5,5 mL y 10,5 mL) donde se espera que eluya la galactosa liberada. Esta última fracción, se liofilizó y se retomó en un mínimo volumen de agua y se guardó para analizar por cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

#### - *Demansidación de lactoferrina*

Se preparó una solución de lactoferrina (9,8 mg/mL) en buffer citrato de sodio 50 mM, pH 4,5 suplementado con acetato de zinc 0,1 mM. Se gel-filtró la solución de lactoferrina en columnas PD-10 (Sephadex G-25) para separar moléculas de bajo peso molecular presentes en el preparado comercial.

Se incubaron 50 mg o 10 mg de  $\alpha$ -Manosidasa inmovilizada sobre agarosa o nanopartículas respectivamente, con 2 mL o 1 mL de lactoferrina (7 mg/mL) durante 24 horas bajo agitación suave en roto-torque a temperatura ambiente. Se separó el derivado inmovilizado por filtración (agarosa) o utilizando un imán (nanopartículas), se lavaron con buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7,5 conteniendo acetato de zinc 0,1 mM y se guardaron para volver a utilizar. El sobrenadante de la demansidación se gel-filtró en columnas PD-10 (Sephadex G-25) equilibrado en buffer acetato de amonio 50 mM pH 5,5, para separar la lactoferrina demansidada de la manosa liberada. Se sembraron 2,0 mL de lactoferrina demansidada, se eluyó con el buffer acetato de amonio 50 mM pH 5,5 y se recogieron las siguientes fracciones; i) la fracción donde eluye la lactoferrina demansidada (volúmenes entre 2,5 y 5,5 mL), la que se guardó para realizar estudios de reconocimiento con lectinas, mediante un ensayo tipo ELISA ya descrito para FhTE; ii) Una segunda fracción (volúmenes entre 5,5 mL y 10,5 mL) donde se espera que eluya la

manosa liberada. Esta última, se liofilizó, se retomó en un mínimo volumen de agua y se guardó para analizar por TLC y HPLC.

#### *Deglicosilación de FhTE con glicosidasas inmovilizadas*

0,5 mL (2-5 mg/mL) de FhTE fueron incubados con 50 mg de glicosidasas inmovilizadas en agarosa o 10 mg de derivados inmovilizados en nanopartículas durante 24 horas a temperatura ambiente. Las enzimas inmovilizadas fueron removidas ya sea por filtración (agarosa) o por ayuda de un imán (nanopartículas). El sobrenadante fue dializado contra PBS pH 7,4 usando membranas con punto de corte de 3 kDa, para posteriormente analizar el reconocimiento de lectinas vegetales, como se describió previamente.

#### *Análisis de azúcares*

##### *- Cromatografía en capa fina*

Se sembraron 15  $\mu$ L de las fracciones a analizar y 5  $\mu$ L de los estándares correspondientes en placas de sílica-gel 60 (20 cm x 10 cm). Se utilizó como fase móvil metanol, cloroformo, acetona, hidróxido de amonio (42:16:25:16). Se reveló con orcinol 2% (0,2 g orcinol monohidrato en etanol: sulfúrico (95:5)) y calor.

##### *- Cromatografía líquida de alta presión*

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) Waters, equipado con detector de índice de refracción, columna Shodex Asahiapak NH<sub>2</sub>P50 4E, (4,6 mm d.i. x 250 mm de largo) a 25°C, con la siguiente fase móvil: acetonitrilo:agua (75:25) y un flujo de 1 mL/min.

#### ***Determinación de la estructura de N-Glicanos***

##### *Deglicosilación de proteínas utilizando PNGasa F*

La estructura de los N-glicanos presentes en FhTE, al igual que los correspondientes a la Lactoferrina antes y luego de ser tratada con la  $\alpha$ -manosidasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas, fue realizada según descrito previamente [132]. Para ello, 1 mg de FhTE o lactoferrina fueron liofilizados y retomados luego en 100  $\mu$ L de buffer de desnaturalización (Urea 7 M, Tiourea 2 M, SDS 2%, 1 M mercaptoetanol en buffer fosfato de sodio 250 mM pH 8,5) durante 1 hora bajo sonicación. Posteriormente, 100  $\mu$ L de buffer de neutralización (Igepal CA-630 15% en buffer fosfato de sodio 250 mM pH 8,5) fue añadido para neutralizar el efecto del

SDS sobre la actividad de la PNGasa F, y la sonicación fue continuada 15 minutos más. Finalmente, se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de sodio 250 mM pH 8,5 y 10 unidades de PNGase F (Promega), dejándose incubar durante al menos 48 horas a 37°C.

#### *Purificación de oligosacáridos*

Previo a su uso, columnas SPE de carbón activado poroso (PGC, Supelco) fueron lavadas (tres veces de 1 mL) con NaOH 1 M, agua MilliQ, acetonitrilo (ACN) 80% conteniendo ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%, y nuevamente agua MilliQ. La mezcla de reacción fue aplicada sobre las columnas PGC SPE y las sales y detergentes fueron removidos por al menos 6 lavados de 1 mL de agua MilliQ. Los oligosacáridos fueron eluidos con ACN 25% / TFA 0,1%, liofilizados y retomados en 3 mL de agua MilliQ. Para eliminar cualquier traza de detergente, se agregaron 1 mg de Detergent-Out beads (Calbiochem) y se incubó durante 30 minutos con agitación. Luego de ello, las Detergent-Out beads fueron removidas por centrifugación, y el sobrenadante liofilizado.

#### *Derivatización de oligosacáridos purificados*

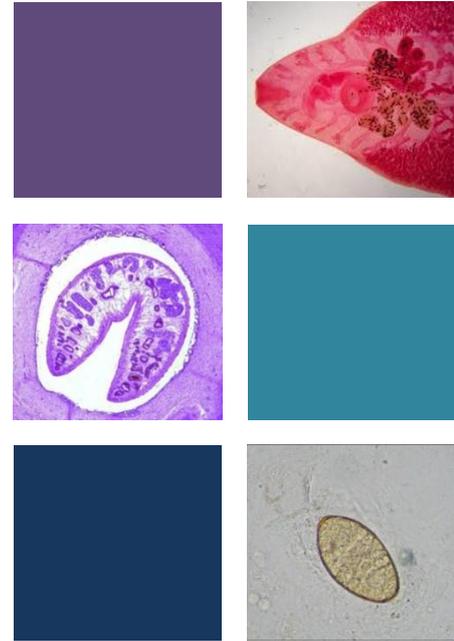
Los N-glicanos purificados fueron sujetos a derivatización usando el fluorocromo 7-amino-4-metilcoumarin (AMC, Sigma Aldrich) mediante aminación reductiva en el extremo reductor de la cadena oligosacáridica. Para ello, el fluorocromo y el reductor fueron preparados frescos, disolviendo 2 mg de AMC en 40  $\mu\text{L}$  de DMSO y 25 mg de borhidruro de sodio y picolina borano en 400  $\mu\text{L}$  de DMSO. La derivatización de los glicanos fue realizada por adición de 10  $\mu\text{L}$  de fluorocromo, 10  $\mu\text{L}$  reductor y 10  $\mu\text{L}$  de ácido acético a los tubos conteniendo los oligosacáridos liofilizados. Luego de una centrifugación rápida, se incubó durante 2 horas a 65°C.

#### *Separación y caracterización de N-Glicanos*

La separación de los glicanos, cuantificación y caracterización fue realizada mediante una nano-columna de WAX polimérica acoplada a un sistema de nano-cromatografía líquida Dionex 300, conectado a un espectrómetro de masa ion trap Thermo Finnigan LCQ decaXP (Thermo Scientific) a través de un detector de fluorescencia Jasco FP2020 (Jasco) con una celda de flujo capilar. Las estructuras glucídicas fueron determinadas en base a la información de fragmentación obtenida por MS/MS.



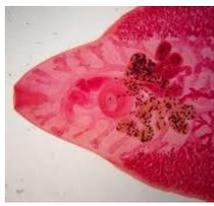
# Capítulo III: Primeras evidencias del rol de los glicanos en la inmunomodulación por *Fasciola hepatica*



Los resultados del presente capítulo fueron publicados en:

Rodríguez, E., et al., Glycans from *Fasciola hepatica* Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced Maturation of Dendritic Cells. PLoS Negl Trop Dis, 2016. 9(12): p. e0004234.





## **Introducción**

Durante los últimos años, se han publicado varios reportes que sugieren que los glicoconjugados parasitarios juegan un rol en la modulación de la maduración de células dendríticas [70]. De hecho, en un reporte reciente se describe que componentes glicosilados del nematodo *Trichuris suis* median la supresión de la producción de TNF $\alpha$  por células dendríticas estimuladas por LPS, a través del reconocimiento de residuos de manosa o GalNAc por CLR $s$  específicos [82]. Interesantemente, también se ha reportado recientemente que componentes de parásitos helmintos que contienen motivos de fucosa pueden interactuar con DC-SIGN presente en células dendríticas y promover la diferenciación de células T a células T colaboradoras foliculares [92].

Durante el transcurso de esta tesis se dispuso de muy poca información acerca de los glicanos producidos por *F. hepatica*. En particular, se podían encontrar reportes describiendo la reactividad de diversas lectinas con la superficie de las miracidias [133] o en el intestino de gusanos adultos [134, 135], al igual que la identificación por espectrometría de masa de glicolípidos con Gal $\beta$ 1-6Gal terminal [136]. Finalmente, nuestro grupo describió la expresión del antígeno Tn (GalNAc-*O*-Ser/Thr) mediante la utilización de anticuerpos específicos [137]. Al igual que su estructura, el rol inmunomodulador de glicanos de *F. hepatica* ha sido pobremente estudiado. Se ha reportado su participación en la activación alternativa de macrófagos mediante la oxidación de las estructuras glucídicas con periodato de sodio [138] o mediante la inhibición de la unión de componentes parasitarios a macrófagos usando anticuerpos específicos para CLR $s$  [77]. Sin embargo, la evidencia acerca de la función de las estructuras carbohidratas en la regulación de la inmunología parasitaria o en la función de células dendríticas es todavía muy pobre.

En el presente capítulo, se muestra como glicoconjugados de *F. hepatica* están involucrados en la modulación de la respuesta inmune del hospedero, promoviendo la producción de IL-4 e IL-10, y suprimiendo la producción de IFN $\gamma$ . Asimismo, se observó que dicho parásito es capaz de inducir un fenotipo semi-maduro de células dendríticas que expresan bajos niveles de MHCII y secretan IL-10. Mediante la oxidación de las moléculas glicosiladas del parásito, se pudo ver que las mismas median la modulación de la maduración de células dendríticas inducida por LPS. Por último, gracias a la realización de ensayos de inhibición se mostró que la inmunomodulación es mediada por reconocimiento a través de un CLR $s$  específico de manosa y del reclutamiento de SHP2.

## Resultados

### *Fasciola hepatica* induce una respuesta inmune de tipo Th2 modificada

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el rol de estructuras glucídicas de *Fasciola hepatica* en la modulación del sistema inmune del hospedero. Para ello, primero se evaluó diferentes parámetros de la inmunidad frente a *F. hepatica* en nuestro modelo experimental y se correlacionó con el curso de la infección y el nivel de daño hepático. Con este fin, ratones BALB/c se infectaron con 10 metacercarias y se evaluó la producción de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN $\gamma$  en esplenocitos de los animales infectados 1, 2 y 3 semanas después de la infección (wpi, por sus siglas en inglés) re-estimulados con un lisado total del parásito adulto (FhTE).

Los esplenocitos de los animales infectados produjeron altos niveles de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-10, citoquinas asociadas a respuestas tipo Th2/regulatorio. A una semana post infección ya se observaron niveles significativamente aumentados de IL-4 e IL-10, llegando a una meseta a las dos semanas post-infección. Por otro lado, si bien se encontró un aumento en la producción de IFN $\gamma$ , la misma fue a niveles muy bajos ( $\leq 200$  pg/ml), más aún si se compara con un incremento de 30 veces para IL-10 (alrededor de 6 ng/ml) (Figura 3.1 A). El incremento de estas citoquinas coincide con la detección del daño hepático evaluado por la actividad alanina transaminasa (ALT) en suero, un marcador de la disfunción hepática [139]. De hecho, la actividad ALT se encontró aumentada 5 veces a las dos semanas post-infección, mientras que aumentó más de 20 veces a las 3 semanas post-infección, en comparación con los niveles detectados en animales control (Figura 3.1B). La actividad ALT aumenta también con la dosis de metacercarias utilizadas para la infección, lo que confirma su utilidad para la detección del daño hepático y el seguimiento de la infección por *F. hepatica* (Tabla 3.1). Además, la actividad de ALT en suero se correlacionó con la evaluación del daño hepático mediante análisis histológico (Figura 3.2). La fuerte producción de IL-4 e IL-10 a las tres semanas post-infección fue confirmada por qRT-PCR, revelando un aumento del entorno de 100 veces en IL-10 y sólo un aumento de 3 veces en la expresión IFN $\gamma$ , con respecto a los animales no infectados (Figura 3.1C).

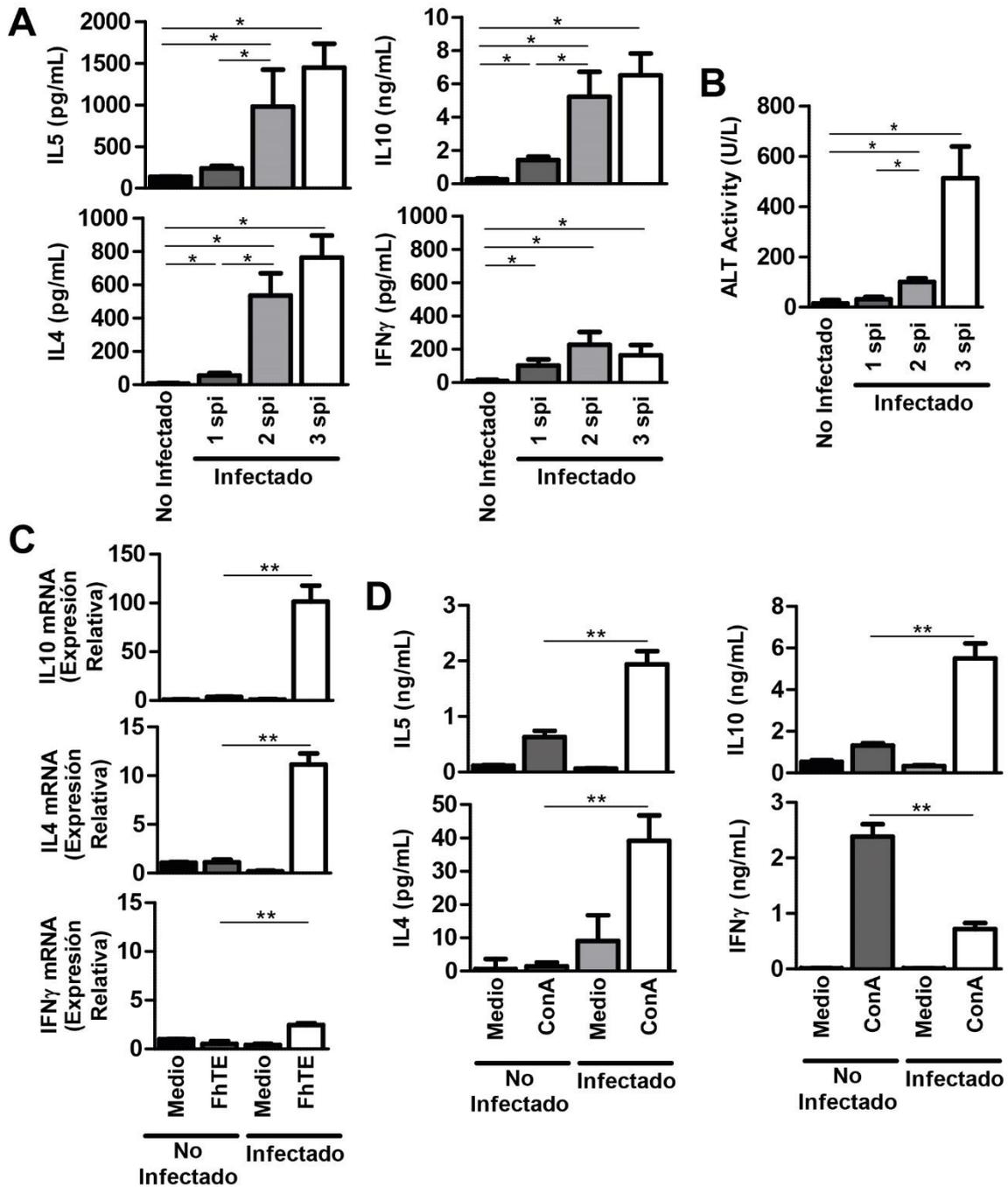


Figura 3.1. *F. hepatica* induce una fuerte respuesta inmune de tipo Th2 modificada, caracterizada por altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-10. (A) ELISA de IL-4, IL-5, IL-10 o IFN $\gamma$  de esplenocitos de animales infectados y no infectados estimulados con FhTE. (B) Se midió la actividad Alanina transaminasa en el suero de ratones infectados y no infectados. (C) Las citoquinas también fueron detectadas por RT-PCR cuantitativa. Los resultados se muestran como cambio relativo respecto a esplenocitos cultivados en presencia de medio, cuya expresión fue definida como 1. La Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control endógeno. (D) Los esplenocitos de los animales infectados y no infectados y se estimularon con ConA (5 mg/ml). Las citoquinas en los sobrenadantes se determinaron mediante ELISA. Los resultados se expresan como la media de tres experimentos independientes ( $\pm$  SD, indicadas por barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ) con respecto a FhTE- o esplenocitos estimulados con ConA de animales no infectados.

Esta fuerte polarización Th2/regulatoria que se observa, también se evidenció con un estímulo policlonal, tal como es la lectina ConA, en esplenocitos de los animales infectados. Éstos produjeron altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-10, mientras que su capacidad de producir IFN $\gamma$  disminuyó significativamente, en comparación con esplenocitos de animales control (Figura 3.1D). Estos resultados están de acuerdo con un reporte previo que describe la polarización Th2 inducida por *F. hepatica* durante la infección [138].

Tabla 3.1. Estudio del daño hepático en ratones infectados con diferentes dosis de metacercarias.

		# ratones con daño hepático macroscópico	Carga parasitaria	Actividad Transaminasa (U/L)
Infectados	No infectados	0	---	9 $\pm$ 2
	5 mets	3	---	260 $\pm$ 32
	10 mets	5	0,4 $\pm$ 0,2	324 $\pm$ 11
	15 mets	5	1,8 $\pm$ 0,4	425 $\pm$ 47

Se evaluó el daño macroscópico al extraer el hígado, la carga parasitaria (cantidad de gusanos presentes en el hígado) y la actividad transaminasa en suero (n=5 por grupo).

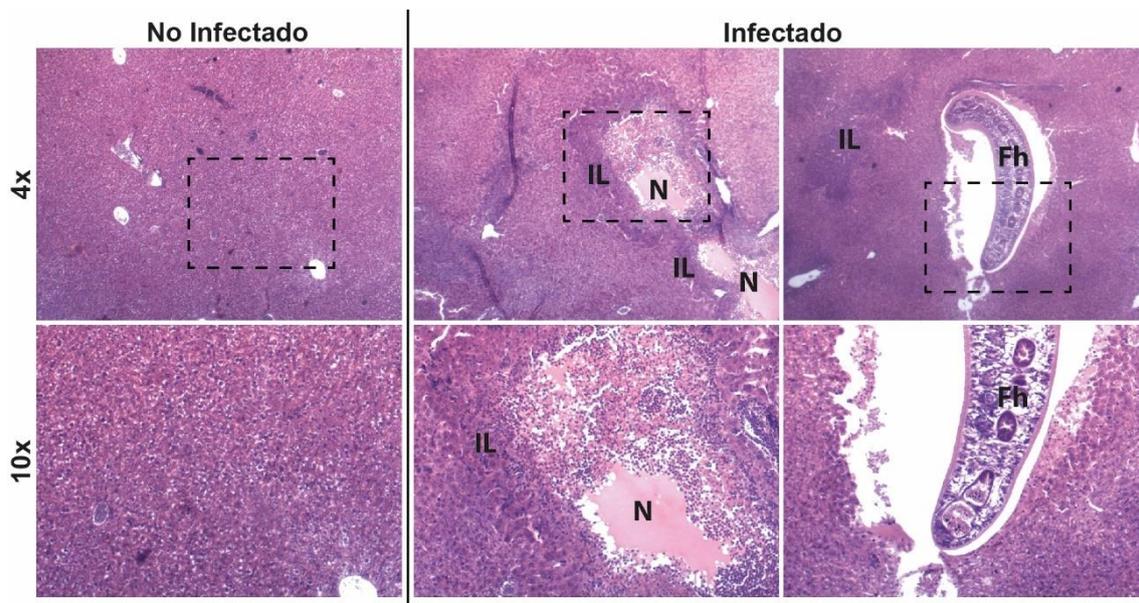
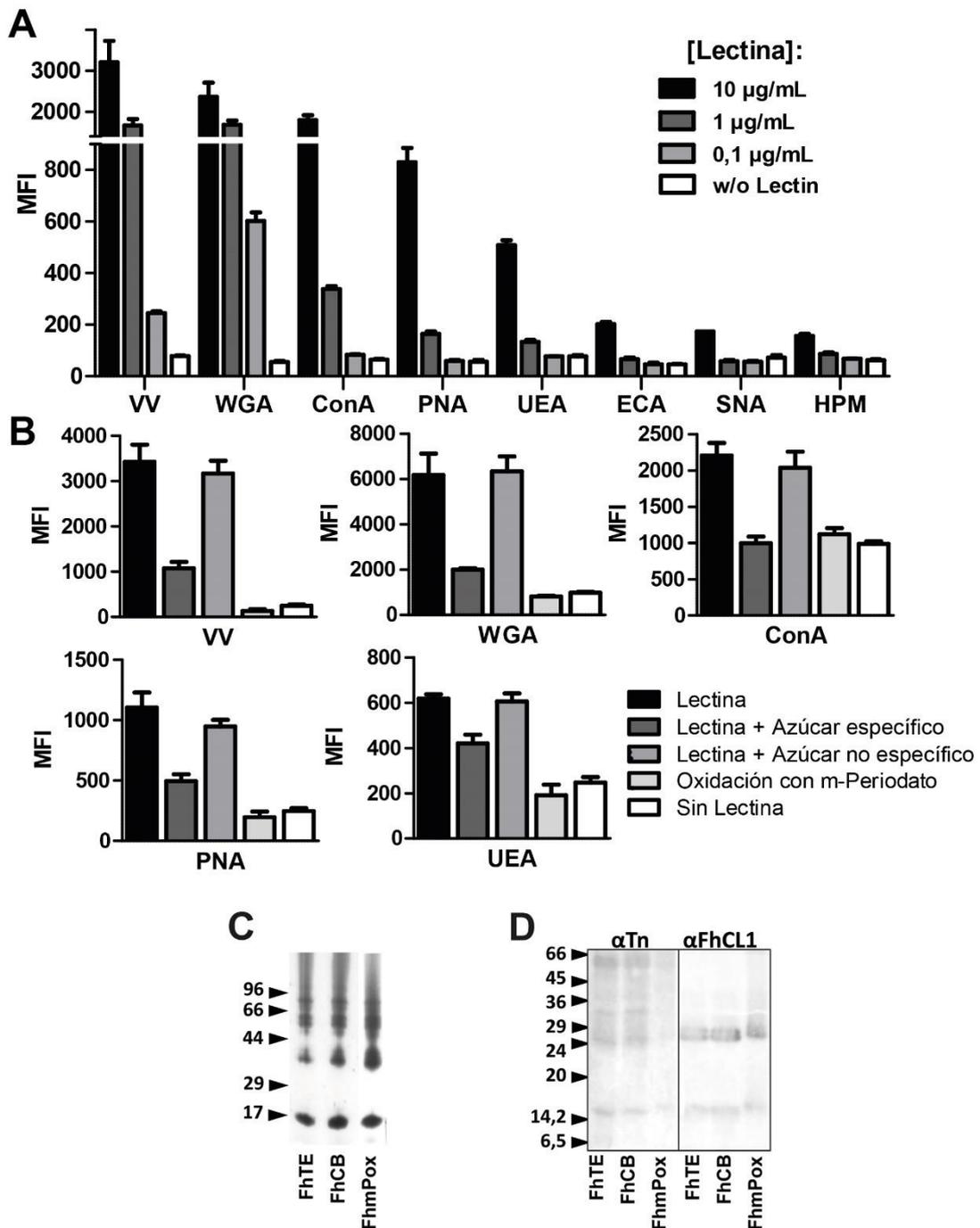


Figura 3.2. Análisis histológico de ratones control y ratones infectados durante 3 semanas. Pasadas 3 semanas de infección, los hígados fueron obtenidos, fijados con formaldehído e incuídos en parafina. Se realizaron secciones que fueron analizadas mediante tinción con hematoxilina y eosina. Se muestran imágenes tomadas a dos aumentos diferentes (x4 y x10). Recuadros presentes en x4 representan las zonas mostradas en x10. N: Necrosis; IL: Infiltrado Leucocitario; Fh: Gusano de *F. hepatica*.

### *Glicanos presentes en F. hepatica portan diversos motivos carbohidratos*

Las estructuras glucídicas presentes en parásitos participan en procesos cruciales como infección o invasión [140, 141]. A pesar de que estructuras glucídicas de diferentes parásitos como *Echinococcus* [142-144], *S. mansoni* [136, 145-147], entre otros [26, 148], se encuentran bien caracterizadas, los correspondientes a lisados totales de *F. hepatica* se encuentran pobremente caracterizados. A fin de aproximarnos a la identificación de los carbohidratos presentes en FhTE, se llevó a cabo un ensayo de reconocimiento por un panel de diferentes lectinas vegetales comerciales. Los glicoconjugados presentes en FhTE fueron reconocidos por las lectinas de *Vicia Villosa* (VVL), *Triticum vulgare* (WGA), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Arachis hypogaea* (PNA) and *Ulex europaeus* (UEA) (Figura 3.3A), revelando la presencia de N-acetil-galactosamina (GalNAc), N-acetil-glucosamina (GlcNAc), manosa (Man) o glucosa (Glc), galactosa (Gal) y fucosa (Fuc), respectivamente. Asimismo, se realizaron ensayos de inhibición, pre-incubando las lectinas con monosacáridos específicos y no específicos, como forma de verificar que el reconocimiento se da a través del dominio de reconocimiento de carbohidratos de la mismas. Se observó una pérdida de más del 70% en el reconocimiento de las lectinas VV, WGA o ConA cuando fueron incubadas con GalNAc, GlcNAc o Manosa, respectivamente, confirmando la especificidad de estas lectinas (Figura 3.3B).

Finalmente, se llevó a cabo ensayos de reconocimiento con lectinas sobre FhTE oxidado previamente con m-periodato de sodio (FhmPox), una técnica usada habitualmente para evaluar el rol funcional de glicoconjugados [68, 82]. Durante este proceso los grupos dioles vecinales presentes en los glicanos son oxidados a grupos aldehído, que son posteriormente reducidos por borhidruro de sodio. Esto conduce a una pérdida de la estructura tridimensional de los carbohidratos, por lo que todo proceso que depende de ella, se verá abolido. De hecho, el reconocimiento de FhTE por parte de las diversas lectinas se pierde completamente con la oxidación de los glicanos (Figura 3.3B). Es importante destacar que el tratamiento no afecta la integridad de las proteínas de FhTE, ya que la movilidad electroforética de las mismas fue similar a la de FhmPox (Figura 3.3C). Además, la oxidación con meta-periodato abolió totalmente el reconocimiento de un anticuerpo monoclonal específico para la estructura de carbohidrato  $\alpha$ GalNAc-O-Ser/Thr [149], que reconoce FhTE, mientras que no modificó el reconocimiento de catepsina-L1 por un anticuerpo policlonal específico (Figura 3.3D). Por lo tanto, la oxidación química de los carbohidratos aboga el reconocimiento de glicanos por las proteínas de unión a carbohidratos, resultando en una estrategia adecuada para estudiar su reconocimiento por las proteínas o receptores, por lo que podría ser útil para estudiar sus funciones biológicas.

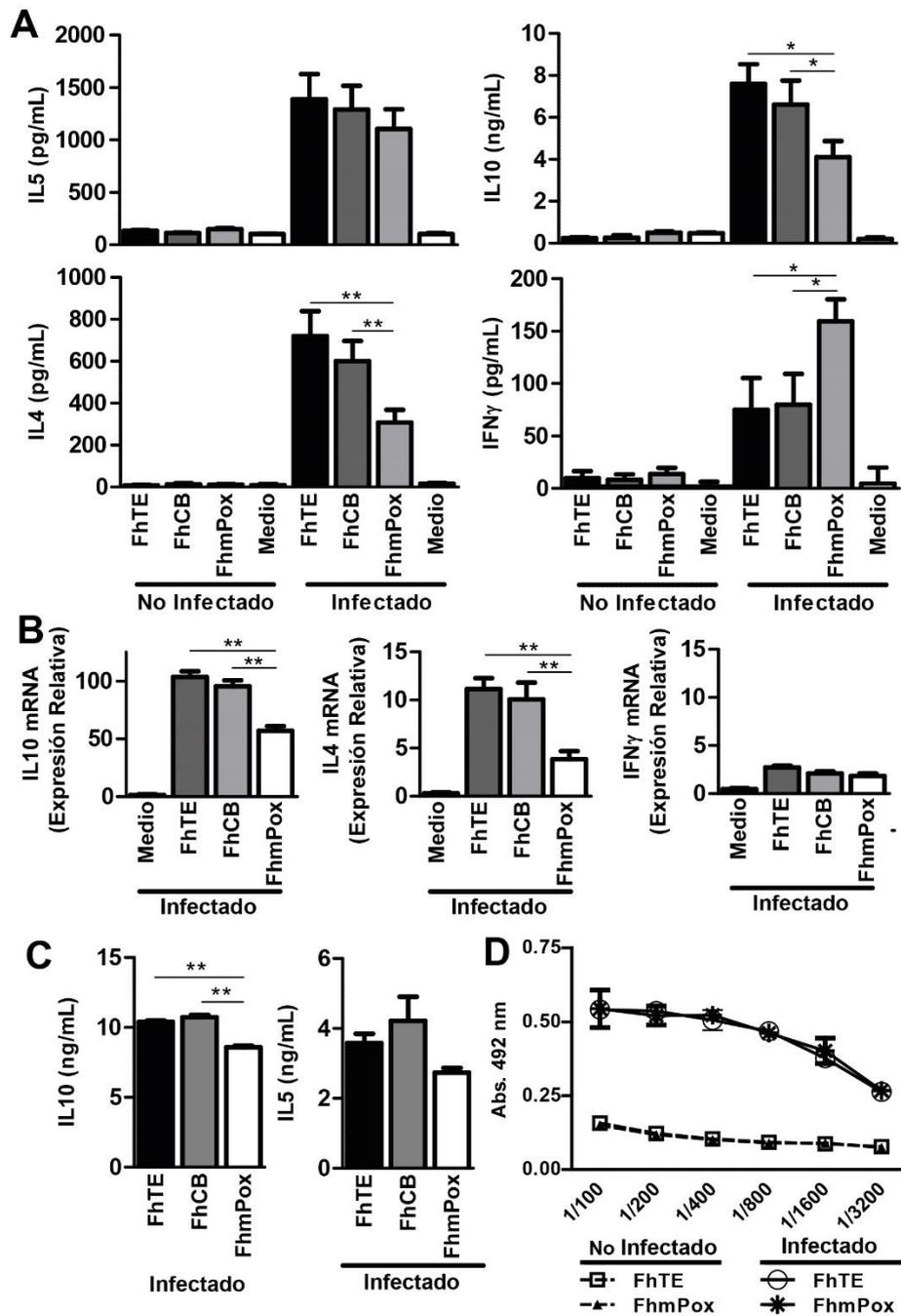


**Figura 3.3.** *F. hepatica* produce una gran variedad de estructuras glucídicas. A) Mediante un ensayo tipo ELISA se evaluó la reactividad con un panel de diversas lectinas vegetales comerciales con FhTE (2,5 µg por pocillo), utilizando diferentes concentraciones de lectinas biotiniladas y estreptavidina Dylight-800. La intensidad de fluorescencia media (MFI, por su sigla en inglés) fue determinada a través de un sistema de imagen infrarrojo. B) La especificidad de glicano fue demostrada mediante ensayos de inhibición utilizando los monosacáridos específicos de cada lectina (50 mM) GalINAc (VV), GlcNAc (WGA), Man (ConA), Gal (PNA) o Fuc (UEA). Alternativamente, la reactividad fue evaluada en FhTE oxidado con meta-operiodato. El lisado parasitario fue separado por SDS-PAGE (15%) y tenido con nitrato de plata (C) o transferido a membranas de nitrocelulosa para la realización de western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-antígeno Tn (clon 83D4) o un anticuerpo policlonal específico contra la catepsina L1. (D)

*Los carbohidratos de F. hepatica participan en la producción de IL-4 e IL-10, y en la disminución de IFN $\gamma$*

Para determinar si las moléculas glicosiladas de *F. hepatica* participan en la inducción de respuestas de tipo Th2 y la supresión de IFN $\gamma$ , se estimularon esplenocitos de animales infectados con componentes parasitarios que fueron previamente oxidados con m-periodato de sodio (FhmPox). Los esplenocitos estimulados con FhmPox produjeron niveles más bajos de IL-4 y IL-10 que las células incubadas con FhTE. Además, en estas condiciones, las células de bazo producen niveles significativamente mayores de IFN $\gamma$  (Figura 3.4A). Por otro lado, no se observaron cambios en los niveles de IL-5. Como control, los esplenocitos se incubaron con FhCB, que consiste en FhTE sometido a todo el tratamiento con excepción de la incubación con m-periodato de sodio, conduciendo a efectos similares a FhTE. La producción de citoquinas fue específica de componentes parasitarios ya que las células de bazo procedentes de animales no infectados no produjeron ninguna de las citoquinas evaluadas (Figura 3.4A). La disminución de IL-4 e IL-10 generada por esplenocitos de animales infectados fue confirmada por qRT-PCR, aunque en este caso no se encontró diferencia significativa en los niveles de producción de IFN $\gamma$  (Figura 3.4B). Las células de los ganglios linfáticos hepáticos (HLN, por su sigla en inglés *Hepatic Lymph Node*) de animales infectados también produjeron niveles menores de IL-10 cuando se estimula con FhmPox cuando se compara con la estimulación con FhTE, sin observarse cambios en la producción de IL-5 (Figura 3.4C).

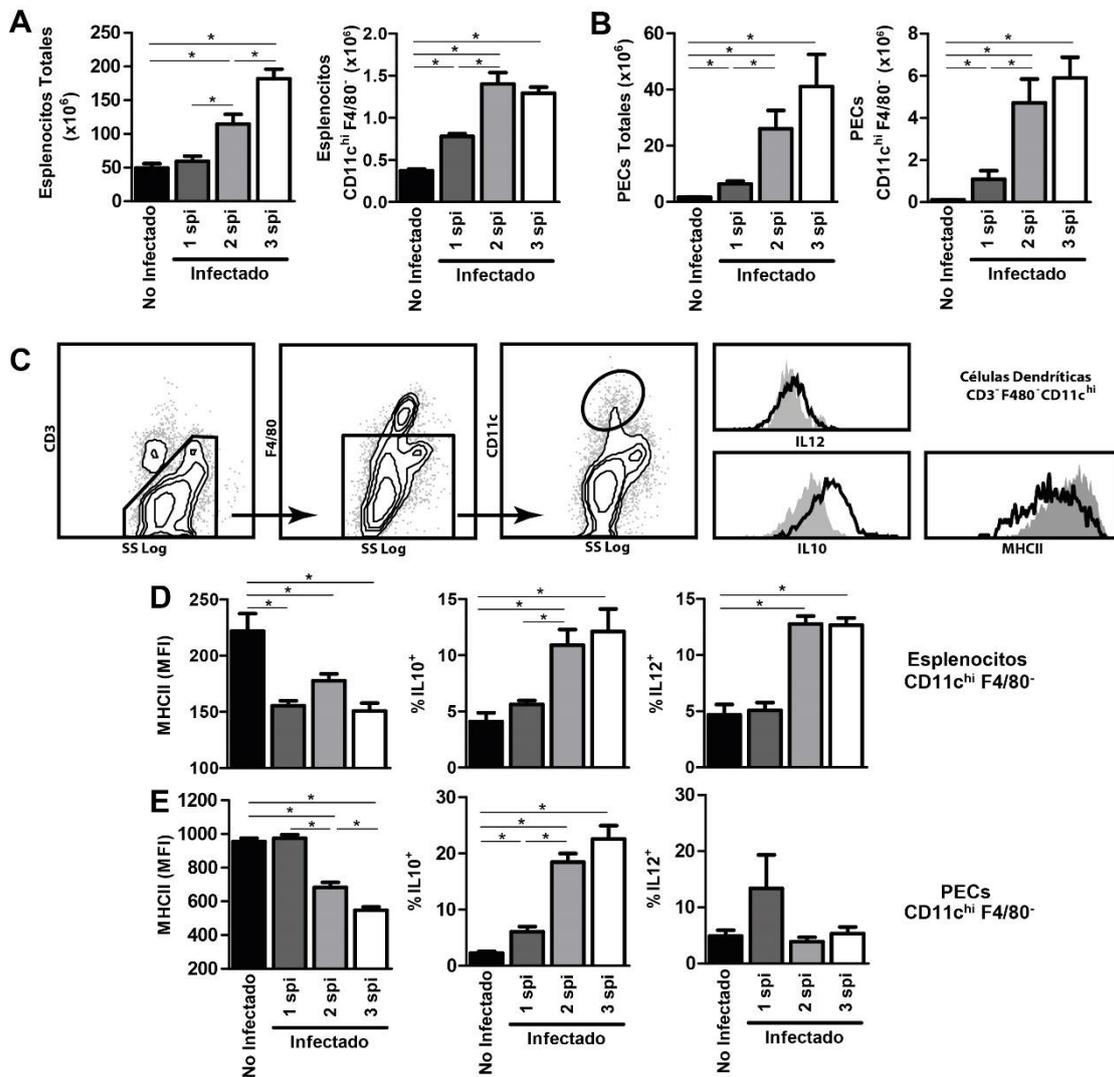
Por último, con el fin de establecer un posible papel de los glicanos en el reconocimiento de moléculas parasitarias por la respuesta inmune humoral, se evaluó el reconocimiento de FhmPox por los sueros de animales infectados. Los anticuerpos IgG de animales infectados reconocieron de manera similar tanto FhTE como FhmPox, lo que sugiere que la oxidación de glicanos no modifica el reconocimiento de los componentes de parásitos por anticuerpos inducidos durante la infección (Figura 3.4D).



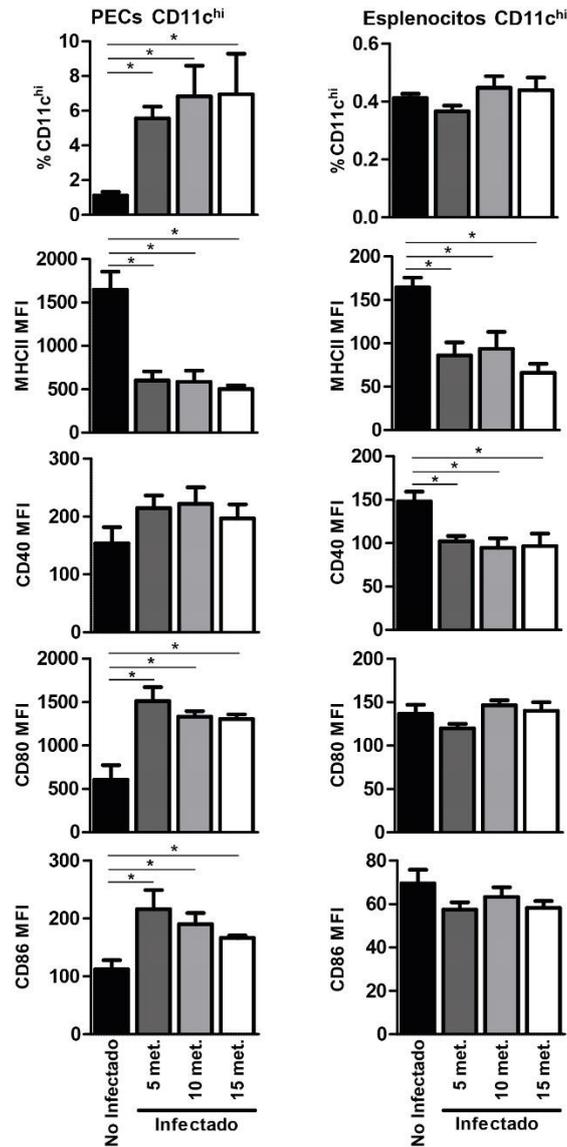
**Figura 3.4.** La oxidación de los glúcidos presentes en FhTE conducen a una menor producción de IL-4 e IL-10 y un aumento de IFN $\gamma$  por esplenocitos ratones infectados. A) Esplenocitos de animales infectados y animales control fueron cultivados en presencia de 75  $\mu$ g/mL de FhTE, FhCB (Control negativo de oxidación) o FhmPox (FhTE oxidado). Se midió la presencia de citoquinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo luego de 72 horas. B) Alternativamente, IL-4, IL-10 e IFN $\gamma$  fueron detectados por qRT-PCR. Los resultados se muestran como cambio relativo respecto a esplenocitos cultivados en presencia de medio, cuya expresión fue definida como 1. GAPDH fue utilizado como control endógeno. C) Las células de ganglios linfáticos hepáticos fueron estimuladas de igual forma que los esplenocitos, y la presencia de IL-5 e IL-10 en el sobrenadante de cultivo fue determinada por ELISA. D) Anticuerpos IgG totales en el suero de animales infectados y no infectados específicos contra FhTE y FhmPox fue evaluado por ELISA. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a esplenocitos de animales no infectados (\*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ).

*F. hepatica* modula las células dendríticas *in vivo*

Ya se han reportado previamente diversas evidencias que muestran que componentes de *F. hepatica* pueden modular la maduración de células dendríticas y su función *in vitro* [53, 59, 71, 150]. Sin embargo, no se ha realizado un estudio exhaustivo de la inmunomodulación de las células dendríticas por parte del parásito. Por lo tanto, con el fin de evaluar más profundamente su papel en la inmunomodulación del huésped por *F. hepatica*, se evaluaron las células dendríticas *in vivo*, tanto en el bazo como en el peritoneo de los animales infectados.



**Figura 3.5.** La infección por *F. hepatica* promueve el reclutamiento de células dendríticas MHCII<sup>low</sup> IL-10<sup>+</sup> tanto en la cavidad peritoneal como en el bazo. Esplenocitos (A) y PECs (B) de animales infectados y no infectados fueron contados y la presencia de células CD11c<sup>hi</sup> fue analizada por citometría de flujo. Las células CD11c<sup>hi</sup> fueron seleccionadas luego de la exclusión de células CD3<sup>+</sup> seguida de la exclusión de células F4/80<sup>+</sup>, como se muestra en la estrategia de gating (C). D) Las células CD11c<sup>hi</sup> fueron también analizadas para la expresión de MHCII y de la producción intracelular de IL-10 e IL-12/23p40. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a esplenocitos de animales no infectados (\*\*p < 0.01; \*p < 0.05).



**Figura 3.6. Las células dendríticas de animales infectados presentan un fenotipo semi-maduro.** Ratones BALB/c (n=5 por grupo) fueron infectados por vía oral con 5, 10 o 15 metacercarias. Pasadas 3 semanas, los mismos fueron sacrificados y Bazo, PECs e hígados removidos. Suspensiones celulares de bazo o PECs fueron analizadas para la expresión de MHCII y moléculas de co-estimulación (CD40, CD80 y CD86) en células CD11c<sup>hi</sup> por citometría de flujo. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a esplenocitos de animales no infectados (\*\*p < 0.01; \*p < 0.05).

Luego de la infección se observó un marcado reclutamiento de células en el bazo y en la cavidad peritoneal de los animales infectados, que aumentaron con el transcurso del tiempo (Figura 3.5A y B, respectivamente). Entre estas células, las células dendríticas (definidas como células CD11c<sup>hi</sup> F4/80<sup>+</sup>) fueron reclutadas tanto en el bazo como en el peritoneo ya desde la primera semana post infección, y su número aumentó con el curso de la infección (Figura 3.5A y B). A pesar del hecho de que todas las células dendríticas presentaron MHC de clase II, su expresión se encontró disminuida (Figura 3.5C-E). De hecho, las células dendríticas esplénicas presentaron niveles de

expresión de MHC de clase II considerablemente menores (reducción de alrededor de 50% de MFI) desde la primera semana post infección, junto con menores niveles de CD40 en su superficie (Figura 3.6).

La expresión de MHCII y de CD40 en la superficie de las células dendríticas no fue modificada al infectar animales con dosis más altas (Figura 3.6). Además, desde la segunda semana post-infección, se evidenció un aumento en la producción de IL-10 en células dendríticas esplénicas (Figura 3.5D). Sin embargo, también se observó un aumento en las células dendríticas productoras de IL-12<sup>+</sup> en el bazo (Figura 3.5D). Las células dendríticas reclutadas en el peritoneo también redujeron la expresión de MHCII (Figura 3.5E), mientras que aumentó la expresión de CD80 y CD86 (Figura 3.6). También hubo un aumento en las células dendríticas productoras de IL-10 en la cavidad peritoneal, mientras que las células dendríticas IL-12<sup>+</sup> se mantuvo en muy baja proporción en el peritoneo (Figura 3.5E).

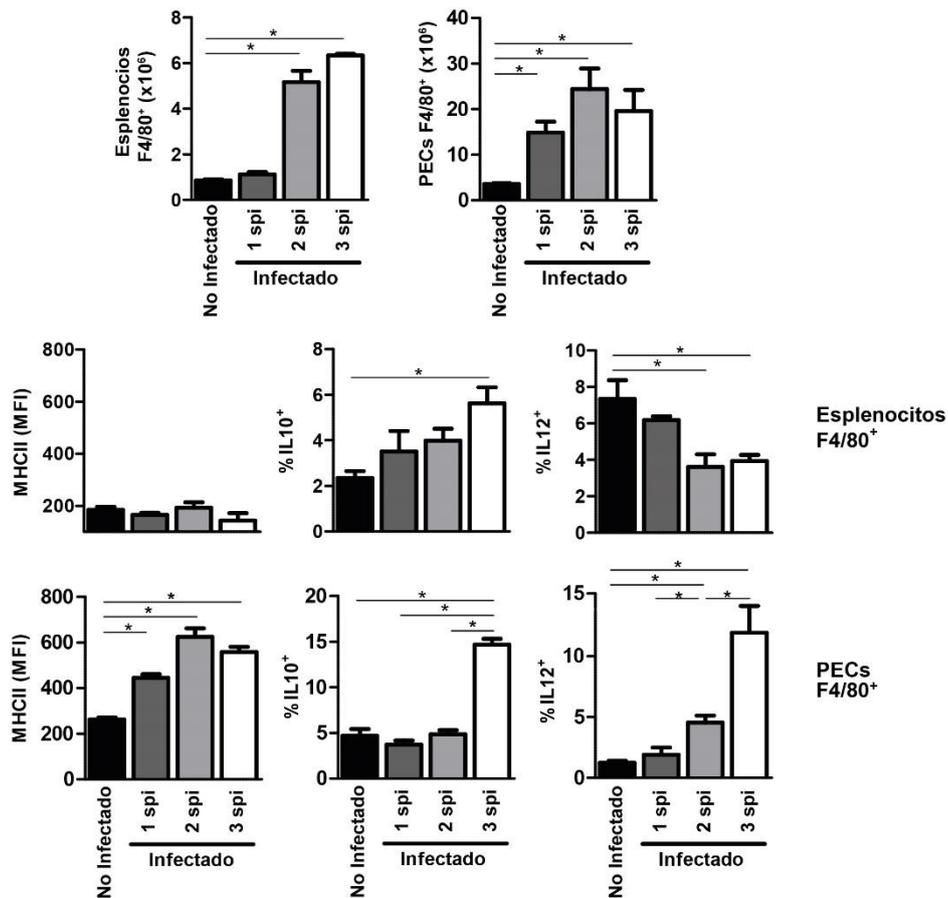
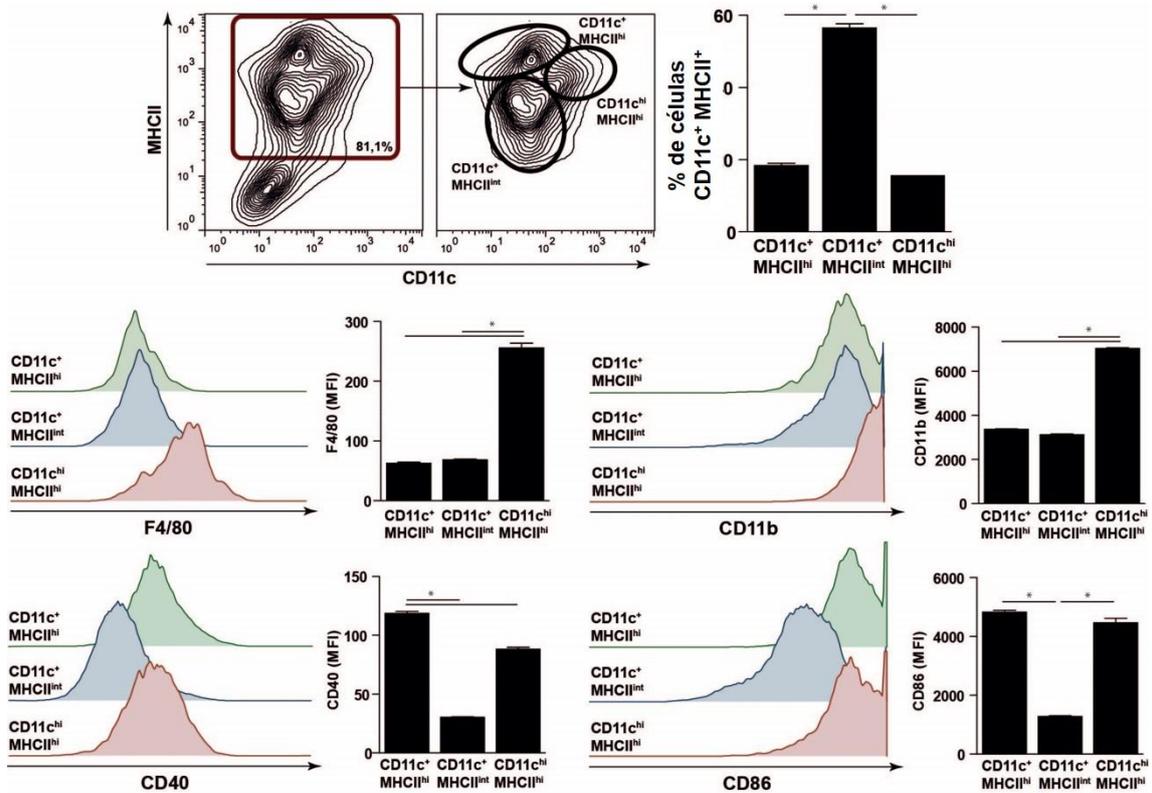


Figura 3.7. La infección por *F. hepatica* promueve el reclutamiento de macrófagos productores de IL-10 tanto en la cavidad peritoneal como en el bazo. Esplenocitos (A) y PECs (B) de animales infectados y no infectados fueron contados y la presencia de células F4/80<sup>+</sup> CD11c fue analizada por citometría de flujo. C) Las células F4/80<sup>+</sup> CD11c fueron también analizadas para la expresión de MHCII y de la producción intracelular de IL-10 e IL-12/23p40. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a esplenocitos de animales no infectados (\*\*p < 0.01; \*p < 0.05).

Los macrófagos, definidos como células F4/80<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup>, también fueron reclutados en el bazo y el peritoneo tras la infección (Figura 3.7). En el bazo se observó también un aumento de macrófagos IL-10<sup>+</sup>, mientras que los IL-12<sup>+</sup> disminuyeron considerablemente (Figura 3.7). Por otro lado, los macrófagos de la cavidad peritoneal aumentaron la expresión de MHCII a partir de la primera post-infección. Además, los macrófagos productores de IL-10 y/o IL-12 también aumentaron en el peritoneo (Figura 3.7).

#### *Glicoconjugados de F. hepatica modulan la función estimuladora de células dendríticas*

Con el fin de determinar si las estructuras glucídicas del parásito son capaces de modular la función de células dendríticas, se evaluó la activación *in vitro* de esplenocitos de animales infectados por células dendríticas. Para ello, se utilizaron células dendríticas murinas derivadas de médula ósea (BMDCs), que fueron obtenidas de la diferenciación de precursores presentes en la médula ósea por incubación con GM-CSF. Recientemente, se ha reportado que las mismas se componen de dos poblaciones celulares: CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>hi</sup>, la cual presenta un fenotipo de células dendríticas, y CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>int</sup> que presenta uno correspondiente a macrófagos [151]. Por ello, antes de utilizarlas, se realizó una caracterización fenotípica con un panel de anticuerpos disponibles en nuestro laboratorio. Como se observa en la Figura 3.8, se obtuvieron tres diferentes poblaciones en nuestras BMDCs: dos que coinciden con lo reportado previamente: CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>hi</sup> y CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>int</sup>, y una población caracterizada por ser CD11c<sup>hi</sup> MHCII<sup>hi</sup>. Las células CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>hi</sup> presentaron una mayor expresión de las moléculas de co-estimulación CD40 y CD86 respecto a las células CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>int</sup> y, a diferencia de lo reportado previamente, no presentaron el marcador de macrófagos F4/80, lo que sugiere que podrían ser dos poblaciones de células dendríticas con diferente estado de activación basal. El marcador F4/80 se encontró presente fundamentalmente en las células CD11c<sup>hi</sup> MHCII<sup>hi</sup>, sugiriendo que las mismas podrían corresponder a macrófagos. Varias diferencias con el paper original podrían explicar las diferencias encontradas, entre ellas la cepa de ratón utilizada y el origen de el GM-CSF utilizado, ya que mientras aquí se utilizó el sobrenadante de cultivo de células transfectadas con dicho factor, en *Helft et al* lo utilizaron de forma recombinante. Si bien se deberían realizar experimentos adicionales para confirmar si las diferentes poblaciones que se obtuvieron corresponden a macrófagos y/o células dendríticas, es importante conocer que se trabaja con una población heterogénea de células, sobre todo al momento de realizar conclusiones basadas en los resultados.



**Figura 3.8. Caracterización fenotípica de las BMDCs.** La expresión de diferentes marcadores de superficie en BMDCs fue analizada por citometría de flujo, utilizando anticuerpos específicos para CD11c, MHCII, CD40, CD86, CD11b y F4/80. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\* $p < 0.05$ ).

Las BMDCs fueron cargadas con FhTE, FhmPox o los respectivos controles. Es importante notar que la viabilidad de las BMDCs cargadas no fue afectada por el tratamiento con los diferentes lisados parasitarios (Figura 3.9A). Posteriormente las células fueron lavadas y co-cultivadas con esplenocitos (Figura 3.9B) o linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados (Figura 3.9C) de animales infectados. Como se puede observar en la figura 3.6B-C, cuando son incubados con BMDCs cargadas con FhmPox, tanto los esplenocitos como los linfocitos T CD4<sup>+</sup> produjeron niveles menores de IL-4 e IL-10 que los esplenocitos estimulados con BMDCs cargadas con FhTE, mientras que no se observaron cambios para IL-5 e IFN $\gamma$ . Asimismo, no se detectó producción de citoquinas cuando se realizó el co-cultivo con esplenocitos o linfocitos T CD4<sup>+</sup> de animales no infectados. Estos resultados sugieren que los glicoconjugados presentes en FhTE modulan la capacidad estimuladora de células dendríticas, induciendo una mayor producción de IL-4 e IL-10 por linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

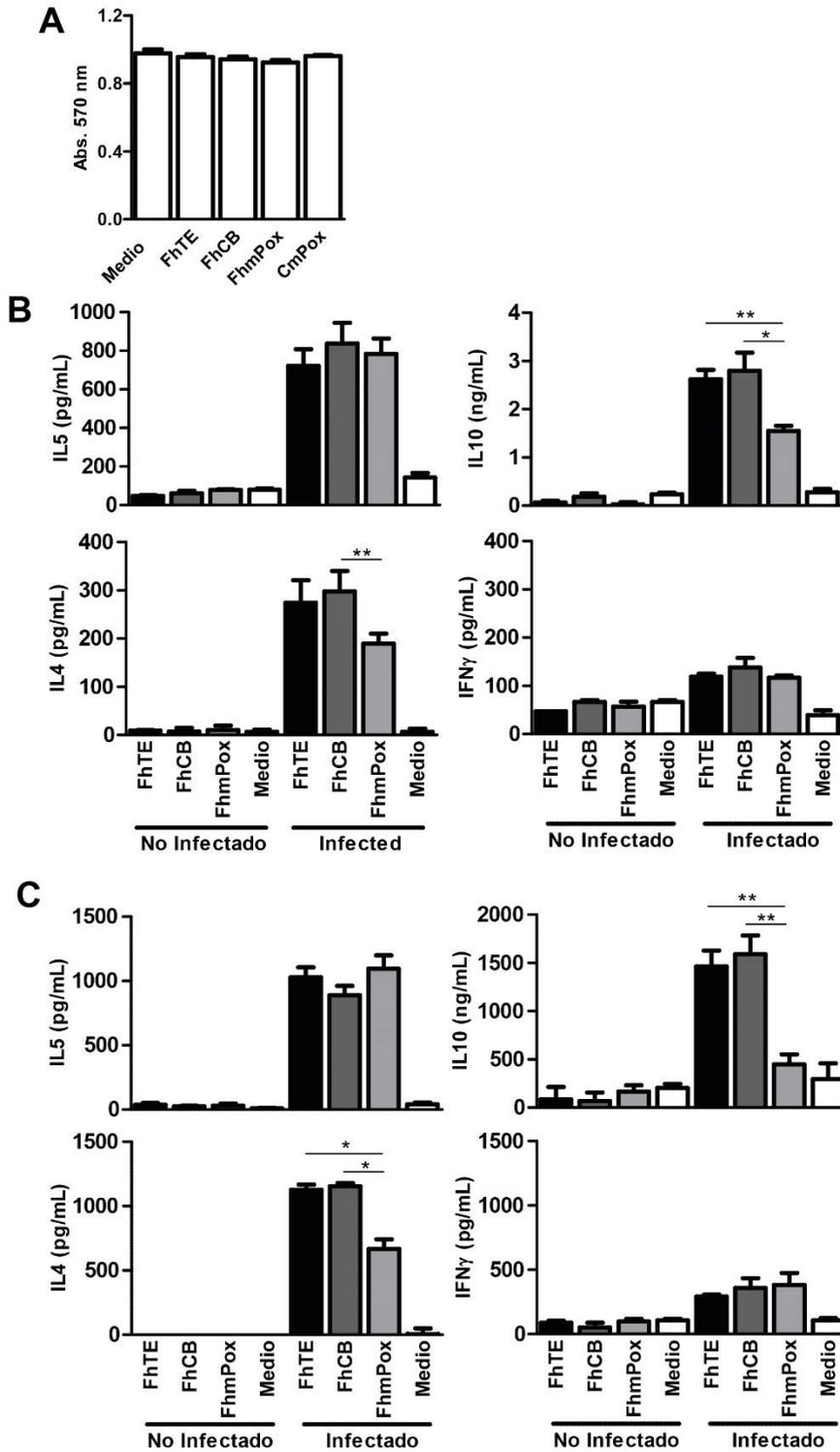
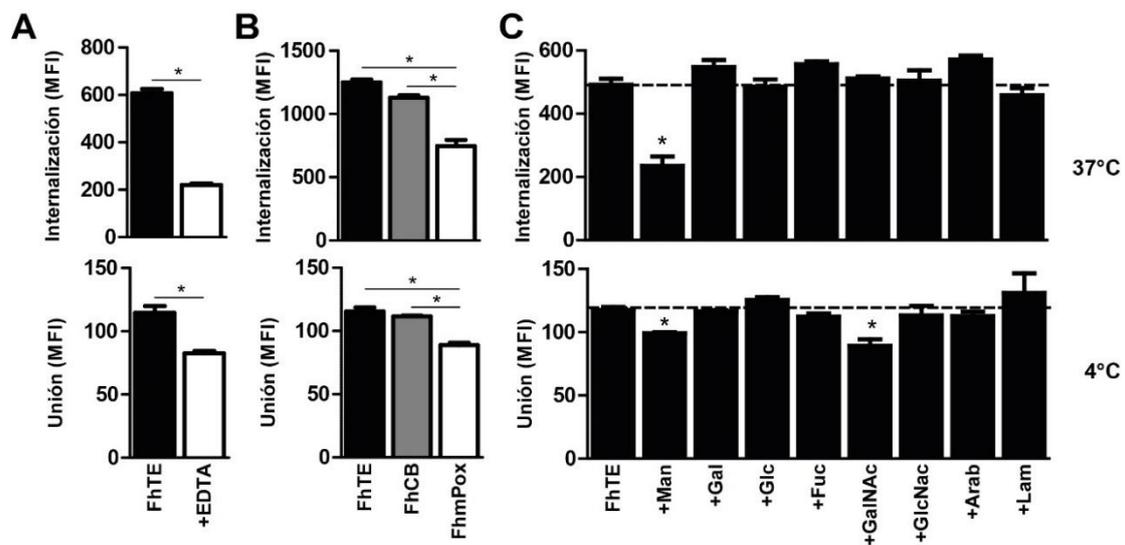


Figura 3.9. Las BMDCs cargadas con FhmPox inducen una menor producción de IL-4 e IL-10 por linfocitos T CD4<sup>+</sup> que BMDCs cargadas con FhTE. Las BMDCs fueron cultivadas en presencia de 75  $\mu$ g/mL de FhTE, FhCB o FhmPox toda la noche a 37°C. A) La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo de MTT. Las BMDCs fueron lavadas luego de la estimulación con los extractos parasitarios, y co-cultivadas por 3 días a 37°C con esplenocitos totales (B) o linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados (C) de animales infectados por 3 semanas o animales control. Luego de 72 horas, se analizó la presencia de citoquinas en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\*\*p < 0.01; \*p < 0.05).

*Los componentes de F. hepatica interactúan y son internalizados por células dendríticas a través de CLRs específicos de Manosa*

Los glicanos pueden modular la función de células dendríticas a través de una variedad de mecanismos. Por ejemplo, pueden interactuar con los receptores lectina expresados en la superficie de las células dendríticas, capaces de endocitar componentes glicosilados y/o desencadenar una señal a través de cascadas dependientes de quinasas [79]. Por ello, se evaluó si los glicoconjugados de *F. hepatica* interactúan con la superficie de células dendríticas o son internalizados por ellas. Con este fin, los componentes proteicos presentes en FhTE fueron marcados fluorescentemente con el fluorocromo ATTO-647, para posteriormente ser incubado con células dendríticas a 4°C (para evaluar su unión) o a 37°C (para evaluar su internalización). La intensidad de fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo en células CD11c<sup>+</sup>.



**Figura 3.9.** Los glicoconjugados de *F. hepatica* interactúan con y son internalizados por células dendríticas en un proceso mediado por CLRs específicos de manosa. A) Las BMDCs fueron cultivadas con FhTE conjugado al fluorocromo ATTO647 por 1 hora a 37°C o a 4°C en medio completo en presencia o ausencia de EDTA (5 mM) y analizado por citometría de flujo en células CD11c<sup>+</sup>. B) FhTE, FhCB o FhmPox conjugados a ATTO 647 fueron incubados también con BMDCs y analizado en las mismas condiciones que en A. C) Ensayos de inhibición con carbohidratos fueron llevados a cabo, preincubando BMDCs con 50 mM de diferentes monosacáridos o laminarina por 30 min. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a BMDCs incubadas únicamente con FhTE-ATTO647 (\*p < 0.05).

Como se muestra en la Figura 3.9A, FhTE puede interactuar y ser internalizado por células dendríticas. Para determinar si esta unión e internalización era dependiente de receptores de lectina tipo C, lo que requiere de Ca<sup>2+</sup>, se preincubaron las células dendríticas con EDTA, un agente quelante, previo al agregado de FhTE-ATTO647. Se observó que alrededor de 70% de la

internalización FhTE se suprime en presencia EDTA, lo que indica que el proceso de internalización fue mediado por receptores dependientes de  $Ca^{2+}$  (Figura 3.9A). Por el contrario, sólo el 25% de la unión se inhibió en presencia de EDTA (Figura 3.9A), lo que sugiere que el reconocimiento dependiente de moléculas glicosiladas es menos relevante en este proceso.

Con el fin de confirmar la participación de glicoconjugados en la internalización o la unión de los componentes de los parásitos a las células dendríticas, el lisado oxidado con meta-periodato, FhmPox y el control correspondiente FhCB también fueron conjugados a ATTO-647 y se incubaron adicionalmente con células dendríticas en las mismas condiciones que FhTE. La oxidación de los glicanos parasitarios arroja como resultado una disminución de alrededor del 40% de la internalización de FhTE, mientras que sólo se observó una reducción del 20% en la unión (Figura 3.9B). Esto indica que los glicanos participan parcialmente en la internalización y unión a células dendríticas de componentes parasitarios. Como era de esperar, no se observó diferencia significativa entre FhTE y FhCB (Figura 3.9B).

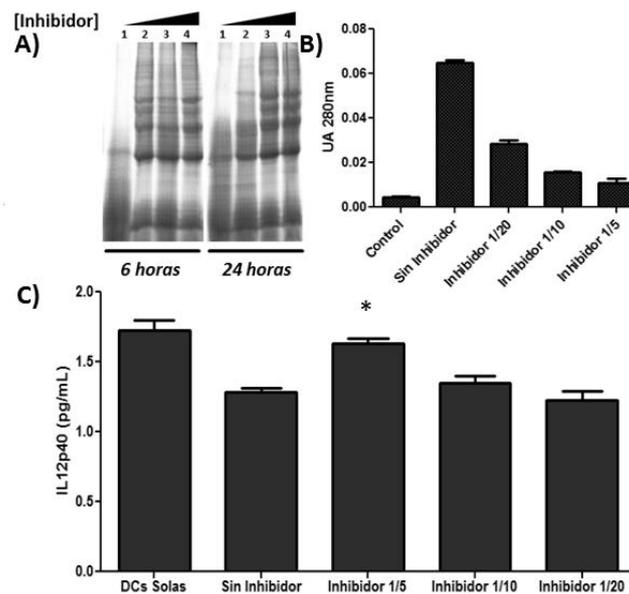
Por último, como forma de aproximarnos a los glicanos que median esta interacción, se llevaron a cabo ensayos de inhibición utilizando monosacáridos, así como laminarina, un ligando del CLR Dectin-1 [152], el cual se incluyó debido a que se ha reportado que Dectin-1 media la internalización de glicoconjugados de *F. hepatica* por macrófagos [77]. Como se muestra en la Figura 3.9C, la unión de FhTE fue inhibida por Manosa y GalNAc, mientras que sólo la manosa fue capaz de inhibir la internalización de FhTE por células dendríticas. La incubación con la laminarina no modificó significativamente ni la unión o ni la internalización de FhTE por células dendríticas, lo que indica que Dectin-1 no está implicado en este proceso.

#### *F. hepatica modula la maduración de células dendríticas a través de un incremento de IL-10 y una disminución de IL-12/23p40*

Posteriormente, se pasó a estudiar el efecto de los glicanos presentes en FhTE sobre la maduración de BMDCs inducida por LPS. Como ha sido reportado que FhTE tiene la capacidad de modular la maduración por LPS de BMDCs, por ejemplo a través de la inhibición en la síntesis de citoquinas [56, 57], nos preguntamos si los glicoconjugados de *F. hepatica* participan en este proceso.

Dado que ha sido ampliamente reportada la presencia de proteasas en diferentes estadios de *F. hepatica* [153], se decidió incluir en FhTE inhibidores de proteasas de forma de mantener la integridad del extracto proteico. Por otra parte, en los próximos capítulos de esta tesis se utilizarán glicosidasas para llevar adelante deglicosilación enzimática de FhTE. La integridad de

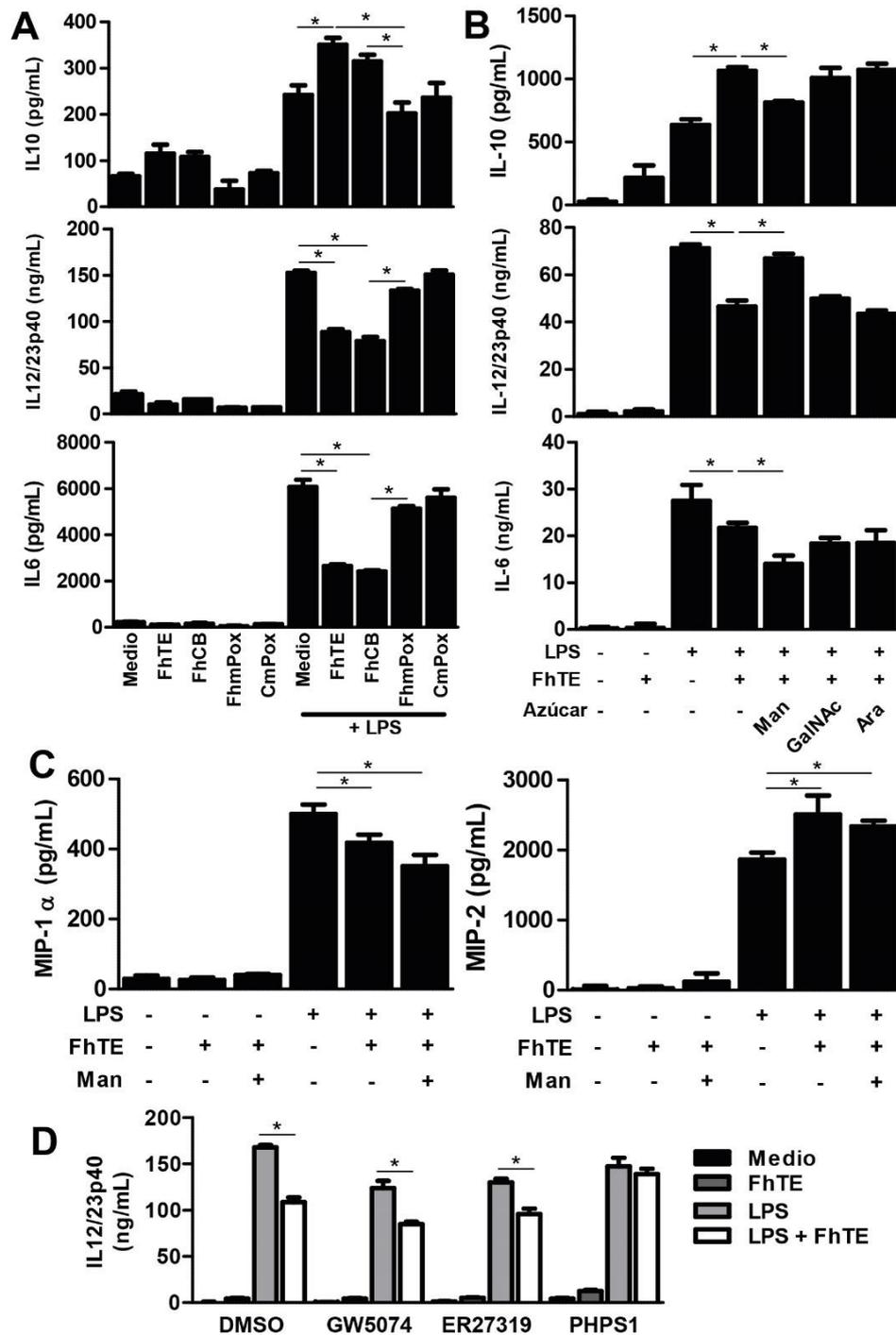
las mismas podría también verse afectada por la presencia de proteasas. Sin embargo, La presencia de inhibidores de proteasas podría afectar el efecto inmunomodulador de FhTE por lo cuál se decidió verificarlo. Es por ésto que se generaron diferentes extractos totales de parásitos adultos de *Fasciola hepatica*, en ausencia o presencia de diferentes diluciones de un cocktail de inhibidores. Se incubaron a 37 °C durante 6 o 24 horas y se cuantificó la actividad proteasa mediante el método de la caseína y se analizó la integridad del extracto mediante SDS-PAGE. En ambas técnicas no se observan diferencias entre las diluciones 1:5 y 1:10 del cocktail de inhibidores (Figura 3.10).



**Figura 3.10. Determinación de la concentración de inhibidores a utilizar en la preparación de FhTE.** A) SDS –PAGE de extractos elaborados con diferente concentración de inhibidores e incubados durante 6 o 24 horas a 37°C. Se incubaron 30 µg de FhTE elaborado Sin inhibidor (1) o en presencia de diferentes diluciones de un cocktail de inhibidores: 2) dilución 1:20; 3) dilución 1:10; 4) dilución 1:5. B) Actividad proteasa en cada uno de dichos extractos determinado por el método de la caseína. C) Efecto de los diferentes extractos sobre la maduración de BMDCs por LPS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a BMDCs incubadas con FhTE sin inhibidor (\*p < 0.05).

Además, se estudió cómo afecta el agregado de inhibidores la capacidad de FhTE de modular la activación de BMDCs inducida por LPS. En este punto, se observa que únicamente cuando se utiliza una dilución 1:5, hay una pérdida significativa de dicha modulación, observada por aumento de la producción de IL12p40, en comparación con un extracto que no presenta inhibidores (Figura 3.10), por lo que se utilizó una dilución al décimo en estudios posteriores.

Con el fin de evaluar si las moléculas glicosiladas de *F. hepatica* son capaces de modular o influenciar la maduración de células dendríticas, se incubaron BMDCs con los diferentes extractos parasitarios (FhTE, FhCB, FhmPox) en presencia o ausencia de un estímulo de maduración (LPS), para luego evaluar la producción de citoquinas en el sobrenadante de cultivo.



**Figura 3.10.** La oxidación de los componentes parasitarios inhibe parcialmente la modulación de la maduración de células dendríticas inducida por LPS. A) Las BMDCs fueron cultivadas con 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FhTE, FhCB o FhmPox en presencia o ausencia de LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) toda la noche a 37°C, para luego analizar las citoquinas IL-6, IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante de cultivo. B) BMDCs fueron pre-incubadas por 45 minutos a 37°C con 10 mM de manosa (Man), N-acetil galactoamina (GalNAc) o arabinosa (Ara) y luego estimuladas con FhTE y analizadas como en A. C) Además, se analizó la presencia de las quimioquinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-2. D) Alternativamente, las BMDCs fueron pre incubadas por 45 minutos con 10  $\mu\text{M}$  de inhibidores específicos de vías de señalización (PHPS1; GW5074 y ER27319) y luego estimuladas con FhTE como en A. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ).

Las BMDCs incubadas con FhTE en presencia de LPS produjeron mayores niveles de IL-10 que las células dendríticas incubadas únicamente con LPS. Interesantemente, cuando se realiza incubación con extractos parasitarios oxidados (FhmPox), las BMDCs producen niveles similares de IL-10 que aquellas células incubadas sólo con LPS, indicando que la oxidación de los glicanos abroga la actividad inmunomoduladora de FhTE sobre células dendríticas (Figura 3.10A). Lo opuesto se observa cuando se miden las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-12/23p40 (Figura 3.10A). Como se esperaba, el control FhCB/LPS se comportó esencialmente como FhTE/LPS. En conjunto, estos resultados indican que glicoconjugados de *F. hepatica* modulan la maduración de células dendríticas mediante un aumento de las citoquinas anti-inflamatorias y una reducción de citoquinas pro-inflamatorias.

Luego, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la capacidad inmunomoduladora de FhTE con los monosacáridos Manosa y GalNAc, ya que ellos fueron capaces de inhibir la unión o internalización de FhTE por células dendríticas. Como monosacárido irrelevante, se utilizó arabinosa (Ara). Como se muestra en la Figura 3.10B, solamente la manosa pudo inhibir la inmunomodulación de FhTE sobre la maduración de células dendríticas. De esta forma, la incubación con manosa restauró los niveles de IL-10 e IL-12/23p40 inducidos sólo por LPS. De todas formas, los niveles de IL-6 no se vieron alterados por la incubación de manosa, sugiriendo que la producción de esta citoquina se dispara por un proceso de señalización independiente de dicho azúcar. La incubación con GalNAc o Ara no modificaron los niveles de las citoquinas evaluadas. (Figura 3.10B). En las concentraciones utilizadas, la incubación con los diferentes monosacáridos no afectó la maduración de LPS ni indujo la producción de citoquinas por sí solos.

La producción de las quimioquinas inflamatorias MIP-1 $\alpha$  y MIP-2 por células dendríticas también fue evaluada. Estas citoquinas regulan el flujo de las células inflamatorias, y pueden ser producidas por células dendríticas en diferentes condiciones patológicas. MIP-1 $\alpha$  es ligando de CCR5, un receptor de quimioquinas expresado en las células Th1, mientras que MIP-2 tiene efecto de quimioatracción sobre células Th2 [154]. Las células dendríticas estimuladas con LPS producen ambas citoquinas. Cuando se incubó en presencia de FhTE, MIP-1 $\alpha$  se vio significativamente disminuida, mientras que MIP-2 aumenta (Figura 3.10C). Sin embargo, los ensayos de inhibición con Manosa no modificaron la producción de ninguna de las dos quimioquinas inducidas por LPS/FhTE.

Finalmente, con el objetivo de proveer de evidencia acerca de posibles CLRs implicados en el reconocimiento de glicanos de *F. hepatica* que contienen Man, se llevaron a cabo cultivos celulares en presencia de inhibidores químicos de diferentes vías de señalización: GW5074,

ER27319 y PHPS1 que inhiben las vías de Raf-1, Syk y Shp2, respectivamente. Estos inhibidores fueron escogidos debido a que un grupo de CLRs que reconocen residuos de Manosa derivados de patógenos, como Dectin-1, MR, SIGNR o DCIR, son expresados por BMDCs y señalizan por alguna de estas vías [79]. Para ello, luego de realizar ensayos de maduración de BMDCs en presencia o ausencia de dichos inhibidores, se evaluó la producción de IL-12/23p40. Ni GW5074 ni ER27319 pudieron modificar la reducción de IL-12/23p40 inducida por FhTE en presencia de LPS. Sin embargo, la incubación de BMDCs con PHPS1 completamente abrogó éste efecto (Figura 3.10D).

### **Discusión**

En este capítulo, mediante la utilización de la oxidación de m-periodato de sodio de los glicanos parasitarios, se mostró que los glicoconjugados presentes en *F. hepatica* están involucrados en la inducción de altos niveles de IL-10 e IL-4 al igual que en la inhibición de IFN $\gamma$  por esplenocitos de animales infectados.

Para evaluar posibles mecanismos de modulación de la respuesta inmune por parte de *F. hepatica*, se focalizó en las células dendríticas, las células presentadoras de antígeno más efectivas y que poseen la habilidad de estimular linfocitos T naive [155]. Durante la infección, las células dendríticas (definidas como células CD3<sup>-</sup> F4/80<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup>) disminuyen la expresión de MHCII, mientras que aumentan la expresión de los marcadores CD80 y CD86, sugiriendo que estas células dendríticas adquieren un fenotipo semi-maduro. La expresión de MHCII es esencial para la habilidad de las células dendríticas de activar linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y varios patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* [156] o *Salmonella typhimurium* [157], inducen su disminución como mecanismo de inmuno evasión.

A continuación, se enfocó en el estudio de los efectos de los glicoconjugados en la maduración *in vitro* de células dendríticas. Nuestros resultados muestran que la oxidación de los glicanos presentes en FhTE, conduce a una pérdida de la capacidad moduladora de dicho extracto, lo que se observa por una pérdida de la IL-10 inducida por FhTE en presencia de LPS, y una recuperación de la producción de IL-6 e IL-12/23 p40 en esas condiciones. Un posible mecanismo que puede explicar estos resultados puede ser la señalización a través de receptores específicos para carbohidratos, como los CLRs, que pueden modular la maduración inducida por TLRs. De hecho, se encontró que tanto la unión como la internalización de los componentes parasitarios por células dendríticas es inhibida por EDTA y manosa, sugiriendo la participación de CLRs específicos para dicho carbohidrato. Asimismo, mediante la realización de ensayos de

maduración de BMDCs en presencia de monosacáridos, se pudo ver que la manosa también puede inhibir parcialmente la inmunomodulación inducida por FhTE, en particular el aumento en la producción de IL-10 y la disminución de IL-12/23p40. Sin embargo, no se observaron cambios para IL-6, MIP-1 $\alpha$  o MIP-2, sugiriendo la participación de varios mecanismos de inmunomodulación en paralelo.

Los CLR $s$  pueden modular la señalización de TLR $s$  en células dendríticas u otras células mieloides, induciendo un incremento de IL-10 y disminuyendo citoquinas pro-inflamatorias, mediante un proceso que se conoce como cross-talk [79, 87]. De hecho, glicanos de diferentes parásitos helmintos como *S. mansoni* [71] y *T. suis* [82] pueden interactuar con diferentes CLR $s$  y modular maduración de las células dendríticas. De acuerdo con nuestros resultados obtenidos con diferentes inhibidores de moléculas que participan en la señalización por CLR $s$ , la fosfatasa SHP2 participaría en la señalización inducida por FhTE. Un posible candidato a receptor es DCIR, un CLR identificado en BMDCs murinas [158] y otras células mieloides [79]. La señalización a través de DCIR induce la fosforilación de un motivo de inhibición de inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM, por su sigla en inglés Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), lo que recluta las fosfatasas SHP1 y SHP2 a su dominio citoplasmático [159, 160], lo que resulta en la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por TLR $s$  [161, 162].

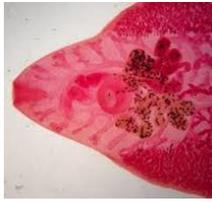
El posible rol de DCIR en el reconocimiento de residuos de manosa presentes en *F. hepatica* y en la modulación cruzada con la señalización de TLR4 puede también explicar el hecho de que células dendríticas productoras tanto de IL-10 como de IL-12 hayan sido identificadas en bazos de animales infectados. De hecho, los subtipos de células dendríticas esplénicas expresan diferentes moléculas de membrana, algunas de las cuales son CLR $s$  [163, 164]. En ratón, dos subtipos pueden ser identificados, las que presentan el marcador CD11b y las que, siendo negativas para dicho marcador, presentan CD8. Ambos subtipos difieren en su capacidad de presentación de antígenos y función estimuladora de linfocitos T [163, 165, 166]. Entre las moléculas expresadas diferencialmente se encuentra DCIR, el cual está expresado en células dendríticas esplénicas que son CD8 $^-$ , pero no las que son CD8 $^+$  [166]. Teniendo esto en cuenta, se podría especular que las células dendríticas CD8 $^-$  que expresan DCIR son el blanco principal de regulación por los glicanos que contienen manosa de *F. hepatica*. Esta idea es apoyada por los datos preliminares en nuestro laboratorio, que muestran que las células productoras de IL-10 en bazo son positivas para el marcador CD11b (datos no mostrados).

A pesar de la hipótesis de que DCIR media la inmunomodulación a través de glicanos de *F. hepatica* que contienen Man, los ensayos de inhibición no lograron restaurar los niveles de IL-6,

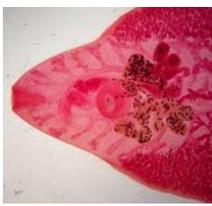
MIP-1 $\alpha$  ni MIP-2. Por ello, es altamente probable que otros receptores o glicanos estén participando en el proceso de inmunomodulación. Se ha reportado recientemente que los glicanos de *F. hepatica* interactúan con el receptor DC-SIGN presente en células dendríticas humanas. Interesantemente, cuando dicho receptor interactúa con glicanos ricos en manosa, modula la producción de citoquinas inducidas por ligandos de TLR, a través de señalización dependiente de Raf-1 [89]. De hecho, la interacción de glicanos de *F. hepatica* y DC-SIGN en células dendríticas humanas induce la diferenciación a linfocitos T colaboradores foliculares [92]. De todas formas, a pesar de que los autores asumen que estos procesos son dependientes de Fucosa, la identidad de los glicanos inmunomoduladores no ha sido investigada. Sin embargo, la evaluación del rol de DC-SIGN *in vivo* se ve dificultado debido a la presencia de ocho homólogos murinos del receptor que no presentan la misma especificidad ni distribución que el receptor humano [104].

En conclusión, los resultados mostrados en el presente capítulo demuestran que los glicoconjugados de *F. hepatica* están involucrados en la inducción de los altos niveles de IL-10 e IL-4 inducidos por el parásito, lo cual está de acuerdo con la creciente evidencia de que glicanos de parásitos helmintos participan en la polarización del sistema inmune del hospedero hacia respuestas tipo Th2/regulador. Además, se mostró que glicoconjugados de *F. hepatica* interactúan con células dendríticas y modulan su función y maduración a través de CLR's específicos de Manosa y señalización dependiente de SHP2.

**Capítulo IV: Inmovilización de glicosidasas para la generación de herramientas para el estudio del rol biológico de los glicanos.**







## **Introducción**

Los glicanos que forman parte de las glicoproteínas y los glicolípidos participan en importantes procesos biológicos tanto a nivel estructural como funcional [60]. De hecho, estructuras glucídicas presente en la superficie son importante en los procesos infectivos y de evasión inmunológica de diferentes patógenos, como bacterias, virus y parásitos [26, 167, 168]. En cuanto a los parásitos helmintos, se ha reportado que glicanos presentes en éstos modulan la respuesta inmune mediante la interacción con receptores específicos [26, 68, 70, 82, 97, 98]. En este contexto, es claro que la elucidación de las estructuras glucídicas y su función biológica es esencial para entender su rol en la patogénesis y permitir el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Esto no es una tarea sencilla debido a la complejidad estructural de los glicanos, lo que hace necesario el uso de estrategias complementarias.

Dentro de la metodología utilizada para la identificación de monosacáridos específicos en la estructura de los glicanos y de su función biológica se encuentran las exoglicosidasas [112]. Como ya se expuso en el capítulo introductorio de esta tesis, el uso de las mismas en forma inmovilizada ofrece ventajas interesantes. Este capítulo se centra en la generación de glicosidasas inmovilizadas como herramientas para el análisis de estructuras glucídicas y de su rol biológico. A pesar de que la inmovilización de enzimas ha sido ampliamente desarrollada a lo largo de las últimas 4 décadas, sorprendentemente las enzimas inmovilizadas no han sido utilizadas con esta finalidad. En particular, se inmovilizó la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y  $\alpha$ -manosidasa de *Canavalia ensiformis*, dos glicosidasas de interés en el análisis glicómico. Se evaluó su funcionalidad como herramienta para la deglicosilación selectiva de galactosa y manosa tanto en glicoproteínas modelo como en lisados de *Fasciola hepatica*, dado que el estudio de la función biológica de sus glicanos es el objetivo central de esta tesis.

## **Resultados**

### *Inmovilización de Glicosidasas*

Existen diferentes soportes y estrategias de inmovilización disponibles para la inmovilización de enzimas. En nuestro caso, se eligieron dos soportes que presentan características diferentes:

- i) Agarosa, un polímero macroporoso natural con un tamaño de partícula de 45-165  $\mu\text{m}$ , tradicionalmente usado en inmovilización de proteínas y sobre cual nuestro laboratorio posee amplia experiencia;
- ii) Nanopartículas de sílica magnéticas, las cuales resultan interesantes debido a su pequeño tamaño (500 nm) y sus propiedades magnéticas.

Asimismo, se utilizó una estrategia de inmovilización covalente, basada en la formación de enlaces tipo isourea entre grupos cianato-éster presentes en el soporte activado y grupos amino expuestos en las enzimas utilizadas. Ambos soportes, fueron activados usando el agente cianilante 1-ciano 4-dimetil amino piridinio tetrafluoro borato (CDAP) (Figura 1.9). Este método de activación es una alternativa menos tóxica a la tradicional activación con bromuro de cianógeno. La activación de soportes de agarosa con CDAP ya ha sido previamente descrita por nuestro grupo de investigación [121], pero no ha sido utilizada hasta el momento para la activación de nanopartículas magnéticas.

**Tabla 4.1. Inmovilización de glicosidasas.**

Soporte	Enzima Aplicada (U/g)	Enzima Inmovilizada (U/g)	Rendimiento Actividad Enzimática (%)	Proteína Aplicada (mg/g)	Proteína Inmovilizada (mg/g)	Rendimiento Inmovilización (%)
<b><math>\beta</math>-galactosidasa</b>						
agarosa	376 $\pm$ 24	251 $\pm$ 33	67 $\pm$ 14	9 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2	67 $\pm$ 6
	763 $\pm$ 109	735 $\pm$ 91	96 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	100 $\pm$ 15
nanopartículas	1520 $\pm$ 212	1429 $\pm$ 98	94 $\pm$ 7	12 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	92 $\pm$ 15
	3041 $\pm$ 423	1716 $\pm$ 7	56 $\pm$ 8	23 $\pm$ 3	19 $\pm$ 1	83 $\pm$ 14
<b><math>\alpha</math>-mannosidasa</b>						
agarosa	84 $\pm$ 11	55 $\pm$ 8	65 $\pm$ 7	2.5 $\pm$ 1.0	2.2 $\pm$ 1.0	88 $\pm$ 14
	104 $\pm$ 3	69 $\pm$ 2	66 $\pm$ 2	5 $\pm$ 0.7	4 $\pm$ 0.1	80 $\pm$ 2
nanopartículas	201 $\pm$ 14	131 $\pm$ 4	65 $\pm$ 7	10 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2	90 $\pm$ 9
	438 $\pm$ 11	132 $\pm$ 4	30 $\pm$ 1	20 $\pm$ 2	13 $\pm$ 0.3	65 $\pm$ 2

En la presente tabla se muestran los resultados obtenidos para la inmovilización de glicosidasas sobre ambos soportes. El rendimiento tanto de actividad enzimática como de inmovilización proteica se determinó como la relación entre proteína/actividad inmovilizada sobre la proteína/actividad aplicada.

Cuando la inmovilización se llevó a cabo utilizando agarosa como soporte, se obtuvieron rendimientos de inmovilización de alrededor de 70% o incluso superiores. La  $\beta$ -galactosidasa se inmovilizó completamente activa, ya que el rendimiento calculado en base a la inmovilización proteica es igual al rendimiento calculado en base a la actividad enzimática, como se observa en

la Tabla 4.1. Por otro lado, la inmovilización de la  $\alpha$ -manosidasa mostró un rendimiento de inmovilización de actividad enzimática menor al de la inmovilización proteica. Esto pone de manifiesto o bien una inactivación parcial debido al proceso de inmovilización o una subestimación de la actividad enzimática del derivado inmovilizado debido a problemas difusionales generados por la inmovilización.

La nanopartícula de silica es un soporte relativamente nuevo para la inmovilización enzimática y por lo tanto no se tienen datos en relación a la capacidad del soporte activado para unir proteínas. Por lo cual se estudió el efecto que la carga enzimática aplicada en los rendimientos de inmovilización. Se encuentra bien documentado que cargas enzimáticas demasiado altas pueden contribuir a generar limitaciones difusionales, dificultando el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, lo cual se torna más crítico en el caso de sustratos macromoleculares [121, 169-172].

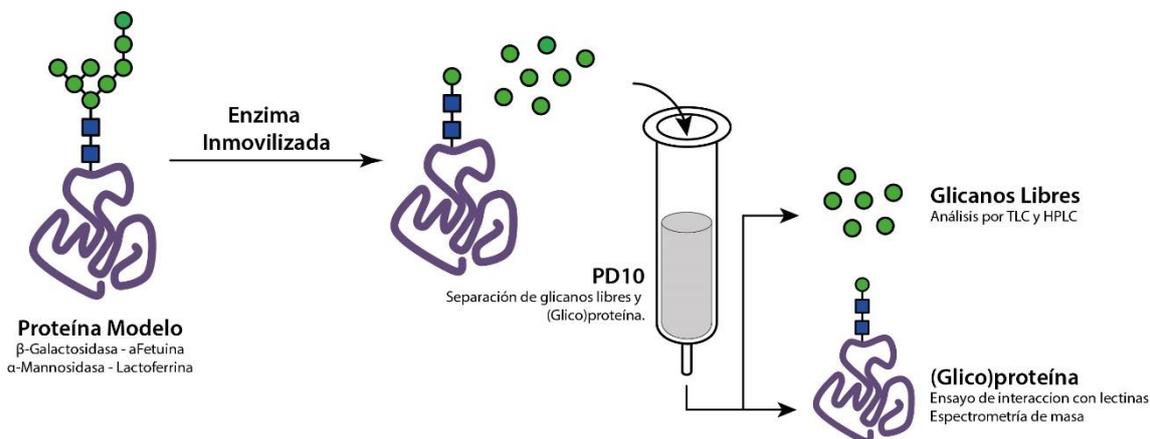
A cargas bajas-moderadas (5-10 mg/g de soporte) se alcanzaron rendimientos de inmovilización superiores al 80% para ambas enzimas. Nuevamente, la  $\beta$ -galactosidasa fue inmovilizada completamente activa, mientras que una inactivación parcial fue observada para la  $\alpha$ -manosidasa. Asimismo, y como era previsible, cuando se aumentó la carga enzimática aplicada (alrededor de 20 mg/g de soporte), se redujeron los rendimientos de inmovilización para ambas enzimas. A su vez, se observó una pérdida de la actividad enzimática no sólo para la  $\alpha$ -manosidasa, sino que también para la  $\beta$ -galactosidasa (Tabla 4.1).

En resumen, se sintetizaron derivados inmovilizados con una buena actividad enzimática para ambas enzimas y para ambos soportes. Los derivados sobre nanopartículas magnéticas con una carga moderada (10 mg/g de nanopartículas) fueron utilizados para realizar ensayos funcionales, tanto con glicoproteínas modelo como con un lisado de *F. hepatica*.

#### *Deglicosilación de proteínas modelo*

Con el fin de evaluar la funcionalidad de las glicosidasas inmovilizadas como herramientas efectivas, se llevaron a cabo deglicosilaciones de dos glicoproteínas modelo: asialofetuina (para la  $\beta$ -galactosidasa) y lactoferrina (para al  $\alpha$ -manosidasa). La asialofetuina fue obtenida por desialilación química de fetuina de suero fetal bovino, lo que expone residuos terminales de  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 Galactosa, haciéndola útil para estudios de degalactosilación [173, 174]. Por otro lado, la lactoferrina bovina fue utilizada para evaluar procesos de demanosilación, ya que dicha

glicoproteína contiene N-glicanos de oligomanosa [175]. La deglicosilación se llevó a cabo como se ilustra en la Figura 4.1 y se describe en el capítulo de materiales y métodos.

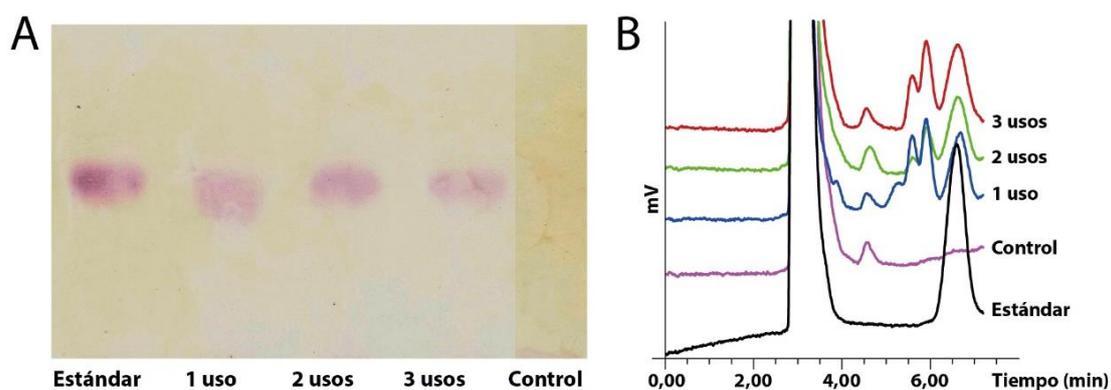


**Figura 4.1. Estrategia utilizada para el análisis de la deglicosilación enzimática de glicoproteínas modelo.** El análisis funcional de los derivados inmovilizados fue realizado mediante su utilización en la deglicosilación de glicoproteínas modelo. Para ello, glicoproteínas modelo (asialofetuína para la β-galactosidasa y lactoferrina para la α-mannosidasa) fueron incubadas con los derivados inmovilizados durante 24 horas. Posteriormente, la fracción de glicanos fue separado de las (glico)proteínas mediante gel filtración. Los glicanos libres fueron analizados por TLC y HPLC, mientras que a las (glico)proteínas se le realizaron ensayos de interacción con lectinas y análisis por espectrometría de masa.

Los procesos de deglicosilación se realizaron a temperatura ambiente y pH óptimo de la glicosidasa correspondiente durante 24 horas. Se seleccionó un tiempo prolongado de forma tal de asegurarnos de que tuviera lugar el proceso de deglicosilación, sobre todo considerando potenciales limitaciones difusionales generadas por el carácter macromolecular de los sustratos sumado al uso de las glicosidasas inmovilizadas. Por otro lado, al no trabajar a la temperatura óptima de las glicosidasas (50°C y 45°C para la β-galactosidasa y α-mannosidasa, respectivamente) su velocidad va a ser inferior a la máxima requiriendo un mayor tiempo de reacción para completar el proceso de deglicosilación. Uno de los objetivos de esta tesis era el uso de glicosidasas inmovilizadas para la deglicosilación de lisados de *Fasciola hepatica* que contiene una gran cantidad de proteasas. Por lo cual, un aumento de la temperatura favorecería su actividad lo cual podría afectar no solo la integridad de las proteínas del extracto durante las incubaciones, sino la de los propios derivados inmovilizados. Una vez transcurridas las 24 horas, la enzima inmovilizada fue retirada de la mezcla de reacción mediante la utilización de un imán, lavada y reusada en varios ciclos. La proteína deglicosilada se separó de las moléculas de bajo peso molecular, como los carbohidratos liberados, mediante cromatografía de exclusión molecular. La fracción conteniendo los carbohidratos fue concentrada por liofilización y analizada por TLC y HPLC, mientras que a la glicoproteína deglicosilada se le realizaron estudios de reconocimientos con lectinas con distintas especificidades.

- *Degalactosilación de asialofetuina*

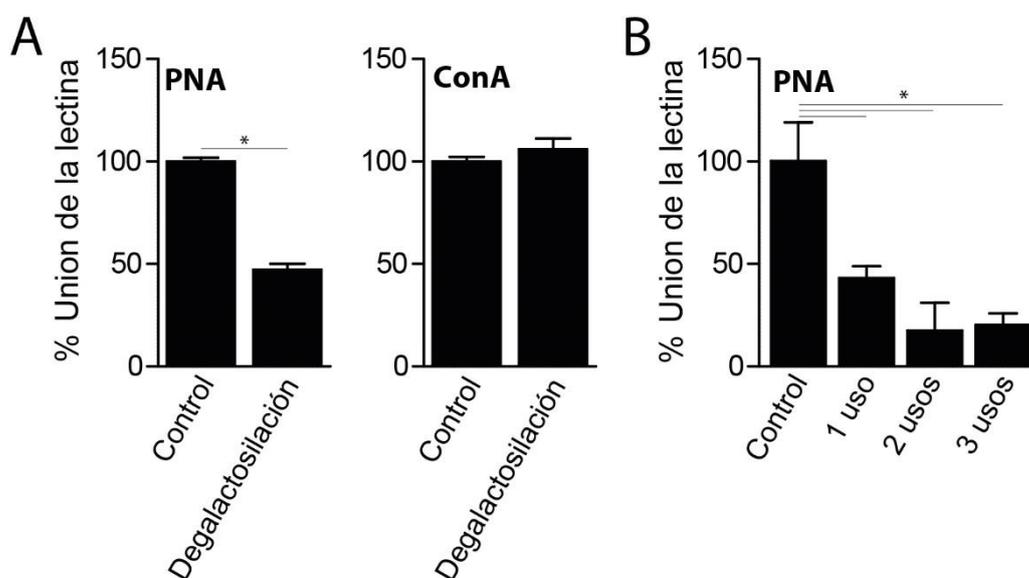
Para el análisis funcional de los derivados de la  $\beta$ -galactosidasa se utilizó como sustrato la asialofetuina. Ésta presenta N-glicanos con residuos de Galactosa  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 terminales, al igual que el antígeno T (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc) presente en los O-glicanos, haciéndola buena candidata para el estudio de degalactosilación [173, 174]. En la Figura 4.2, se puede observar el análisis de los carbohidratos liberados durante el procedimiento de degalactosilación de la asialofetuina utilizando derivados inmovilizados sobre nanopartículas magnéticas. El estudio por TLC permite observar bandas con un factor de retención ( $R_f$ ) similar a la galactosa, utilizada como estándar, en las fracciones carbohidratas correspondientes a las diferentes degalactosilaciones realizadas (Figura 4.2). Estos resultados fueron confirmados por HPLC donde se observa un pico con el mismo tiempo de retención ( $R_t$ ) que la galactosa en todas las fracciones carbohidratas analizadas, excepto en el control. Por lo tanto, puede concluirse que la galactosa fue liberada como consecuencia de la degalactosilación enzimática (Figura 4.2). Es más, los derivados inmovilizados pudieron ser reusados sin notar una pérdida de la efectividad.



**Figura 4.2.** Análisis de la deglicosilación utilizando  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas. El análisis se llevó a cabo mediante TLC (A) y HPLC (B) de las fracciones carbohidratas obtenidas en los diferentes reusos del derivado enzimático. El control consistió en la incubación de la asialofetuina bovina con nanopartículas, sin contener enzima inmovilizadas. Como estándar se utilizó Galactosa 10 mM.

Por otro lado, la fracción conteniendo la asialofetuina degalactosilada fue analizada mediante un ensayo tipo ELISA de reconocimiento por la lectina de *Arachis hypogaea* (PNA, específica para Antígeno T y  $\beta$ Gal Terminal) y Concanavalina A (ConA, específica para  $\alpha$ Man y  $\alpha$ Glc) (Figura 4.3A). Como se esperaba, luego de que la asialofetuina fue degalactosilada con la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada, se observó una disminución del reconocimiento de PNA, sin observarse cambios en el reconocimiento de ConA. Esto muestra no sólo la efectividad del tratamiento, sino además su especificidad. Por último, se analizó como el reuso del derivado

inmovilizado no afecta su capacidad para deglicosilar la asialofetuina y reducir el reconocimiento por PNA (Figura 4.3B).



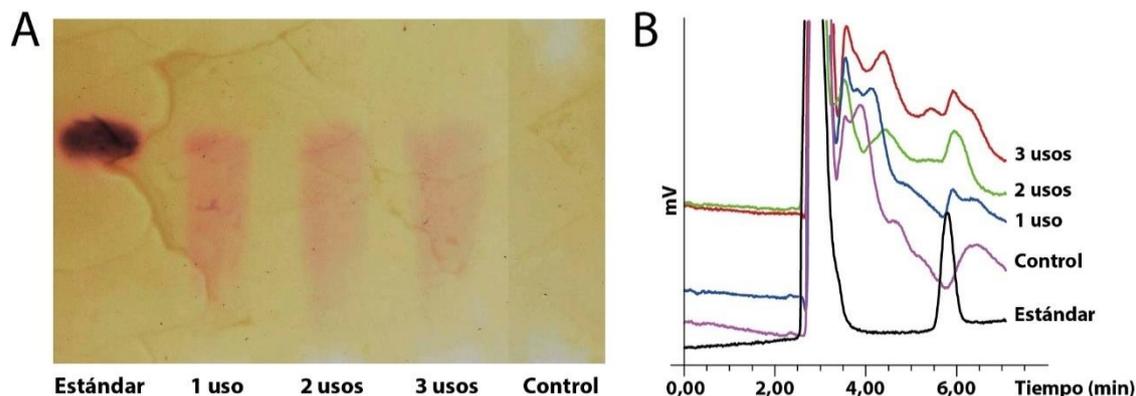
**Figura 4.3. Reconocimiento de la asialofetuina degalactosilada por las lectinas PNA y ConA.** Se analizó la capacidad de las lectinas PNA y ConA de reconocer las glicoproteínas antes y después del tratamiento con la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas. Para ello, se llevó a cabo un ensayo tipo ELISA, en el cual se sensibilizaron placas con la porción de (glico)proteína recuperada después de la gel filtración (1  $\mu$ g por pocillo), para posteriormente incubar con las lectinas biotilnadas y streptavidina-HPR. Para el cálculo del porcentaje de unión de cada lectina, el promedio de las absorbancias del control, conteniendo asialofetuina en presencia de nanopartículas sin enzima inmovilizada, se tomó como 100%. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0.05$ ).

#### - Demanosilación de Lactoferrina

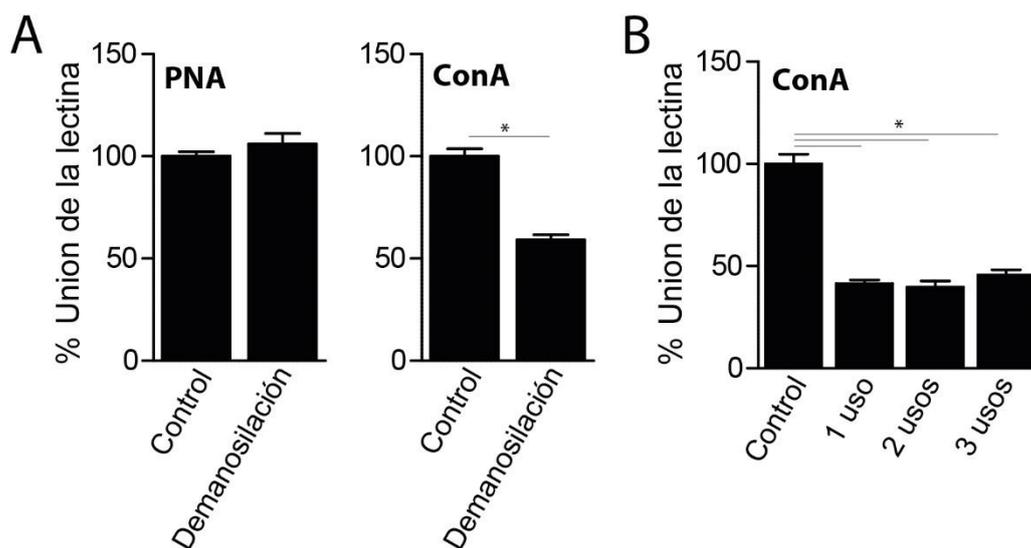
La misma estrategia utilizada para la degalactosilación de la asialofetuina fue utilizada para evaluar a nivel funcional los derivados inmovilizados de la  $\alpha$ -manosidasa, pero en este caso utilizando la lactoferrina bovina como sustrato, ya que la misma posee N-glicanos con alto contenido en manosa. Como se puede observar en la Figura 4.4A, el análisis de la fracción glucídica mediante TLC muestra bandas con Rf similar al estándar de manosa para todos los ciclos de demanosilación realizados. Se obtuvieron resultados similares al analizar las muestras por HPLC, donde se observan picos con Rf similar al del estándar, lo cual confirma la efectividad del proceso de demanosilación realizado con la enzima inmovilizada.

Al igual que se realizó para la degalactosilación de asialofetuina, la fracción proteica fue utilizada para realizar ensayos de reconocimiento por las lectinas PNA y ConA. En la Figura 4.5A se puede observar que la demanosilación conduce a una pérdida en el reconocimiento de la lactoferrina

por parte ConA de aproximadamente 50%. Sin embargo, no se observó pérdida en el reconocimiento de PNA, confirmando la especificidad del proceso de deglicosilación. De todas formas, no se produjo una pérdida total de reconocimiento, probablemente debido a que no todas las manosas presentes fueron removidas. Asimismo, se observó que el reuso del derivado inmovilizado no afecta su capacidad de reducir el reconocimiento de ConA (Figura 4.5B).

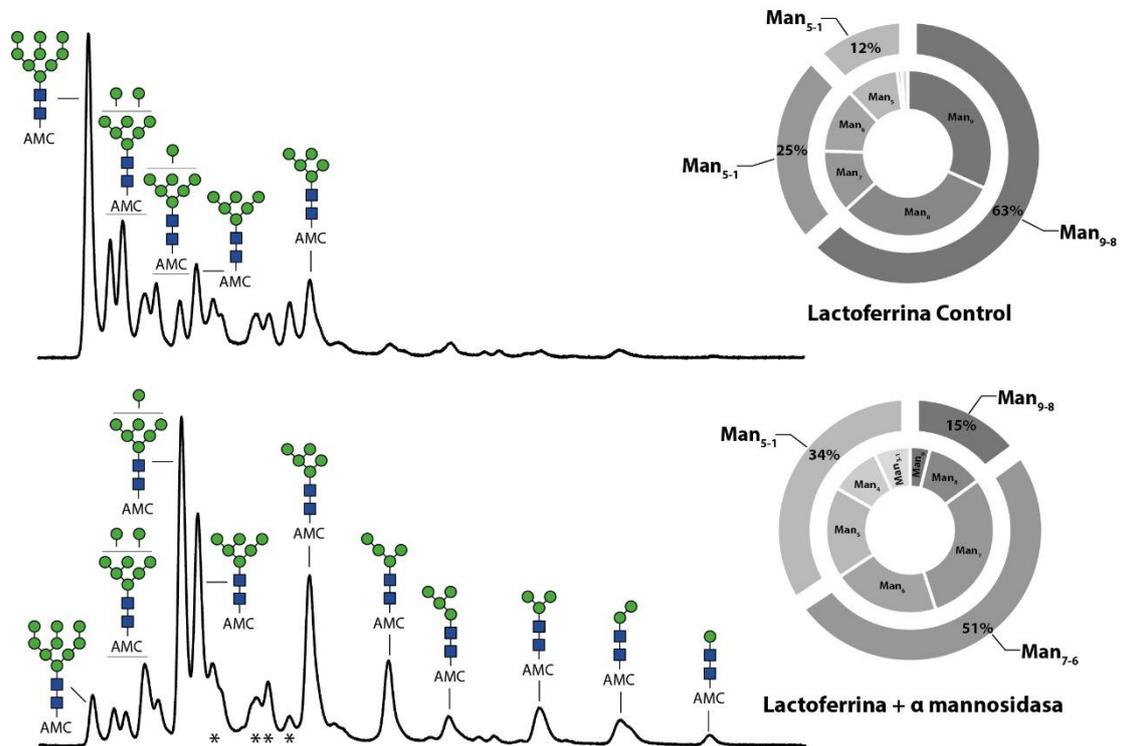


**Figura 4.4. Análisis de la deglicosilación utilizando  $\alpha$ -manosidasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas.** El análisis se llevó a cabo mediante TLC (A) y HPLC (B) de las fracciones carbohidratos obtenidas en los diferentes reusos del derivado enzimático. El control consistió en la incubación de la lactoferrina bovina con nanopartículas, sin contener enzima inmovilizadas. Como estándar se utilizó Manosa 10 mM.



**Figura 4.5. Reconocimiento de la lactoferrina demanosilada por las lectinas PNA y ConA.** A) Se analizó la capacidad de las lectinas PNA y ConA de reconocer las glicoproteínas antes y después del tratamiento con la  $\alpha$ -manosidasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas. B) Asimismo, se estudió el reconocimiento de ConA por la lactoferrina deglicosilada con diferentes reusos del derivado enzimático. Para ello, se llevó a cabo un ensayo tipo ELISA, en el cual se sensibilizaron placas con la porción de (glico)proteína recuperada después de la gel filtración (1  $\mu$ g por pocillo), para posteriormente incubar con las lectinas biotiladas y streptavidina-HPR. Para el cálculo del porcentaje de unión de cada lectina, el promedio de las absorbancias del control, conteniendo asialofetulina en presencia de nanopartículas sin enzima inmovilizada, se tomó como 100 %. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0.05$ ).

Con el fin de determinar cambios en la estructura de los N-glicanos debido a la acción enzimática de la  $\alpha$ -manosidasa, se realizó un análisis de los mismos mediante espectrometría de masa, según método descrito en la sección materiales y métodos.

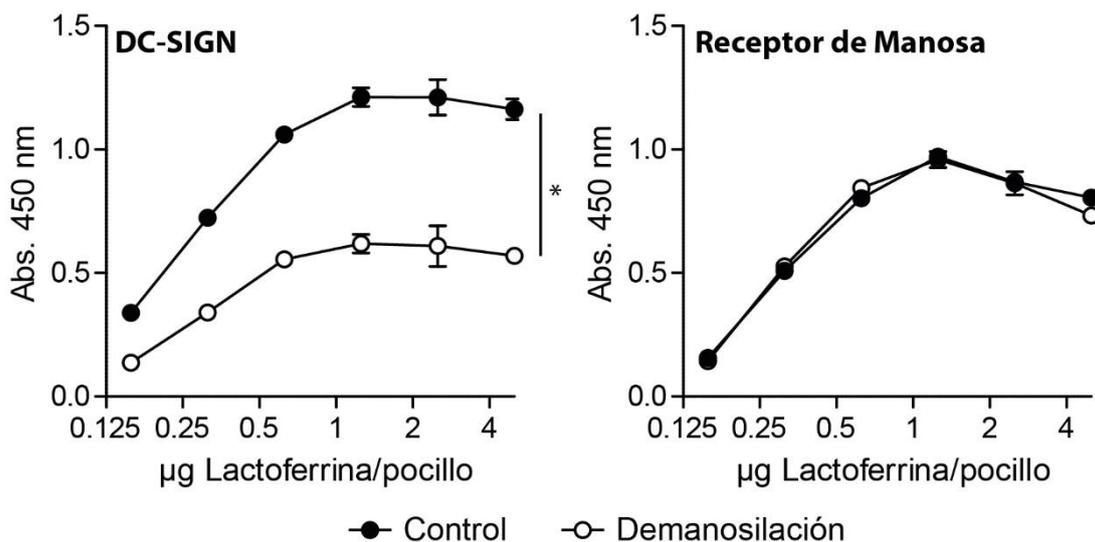


**Figura 4.6. Determinación de la estructura de los N-glicanos presentes en la lactoferrina control y en la tratada con  $\alpha$ -manosidasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas.** Para ello, los N-glicanos presentes en la lactoferrina fueron obtenidos mediante tratamiento con la PNGasa F, para posteriormente purificarlos, conjugarlos al fluorocromo AMC y analizarlo mediante separación por HPLC y MS/MS. En la figura se muestra el cromatograma correspondiente a la separación por HPLC y las estructuras de cada pico que fueron identificadas luego del análisis de los datos de fragmentación en MS/MS. Asimismo, se muestra la cuantificación de la estructuras identificadas, realizada teniendo en cuenta el área de cada pico identificado. Los picos que presentan un \* representan estructuras que no coinciden con estructuras típicas de N-glicanos (no presentan el core Hex (HexNAc)<sub>2</sub> AMC), probablemente debido a la presencia de contaminantes en que fueron co-purificados con los N-glicanos.

La Figura 4.6 muestra el perfil de N-glicanos obtenido de la lactoferrina bovina control y de la sometida al tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa. Mientras la primera presenta un alto contenido de estructuras oligomanosa (en particular conteniendo 8 o 9 manosas), la lactoferrina demanosilada presentó una variedad menos compleja de estructuras oligomanosa, siendo especialmente abundante las estructuras con 6 y 7 manosas, aunque apareciendo además estructuras conteniendo 3, 2 o incluso 1 manosa. Sin embargo, si bien se observa una disminución en la cantidad de manosa presente en los N-glicanos, no se obtuvo una remoción total, lo cual concuerda con el resultado de reconocimiento por ConA. Esto podría deberse a las

condiciones de deglicosilación utilizadas, como por ejemplo una temperatura inferior a la óptima de la enzima, una relación cantidad de Unidades de glicosidasa/mg de glicoproteína insuficiente o impedimentos estéricos que dificultaran el acceso de las manosas más internas al sitio activo de la enzima.

En resumen, nuestros resultados evidencian que los derivados de  $\alpha$ -manosidasa utilizados son capaces de remover selectivamente la manosa de glicoproteínas, pero que las condiciones de deglicosilación pueden ser mejoradas. A pesar de ello, nos preguntamos si el cambio inducido en el contenido de manosa presente en los N-glicanos podría repercutir en el reconocimiento de la lactoferrina por parte de receptores celulares. Para ello, se eligió estudiar la interacción de los receptores DC-SIGN y el MR con las variantes de lactoferrina con diferente perfil glucídico. Para ello, se llevó a cabo un ensayo tipo ELISA con las fracciones proteicas obtenidas, utilizando las proteínas quiméricas CLR-hFc, como se describe en materiales y métodos. Como se muestra en la Figura 4.7, la demanosilación de la lactoferrina repercutió en su reconocimiento por parte de DC-SIGN, pero no por parte del MR. Esto podría deberse a que DC-SIGN reconoce fundamentalmente estructuras de 9 u 8 manosas, las cuales presentan una gran disminución luego del tratamiento por  $\alpha$ -manosidasa [86]. Sin embargo, todavía hay presente una cantidad importante de manosas, que podrían ser ligandos del MR.

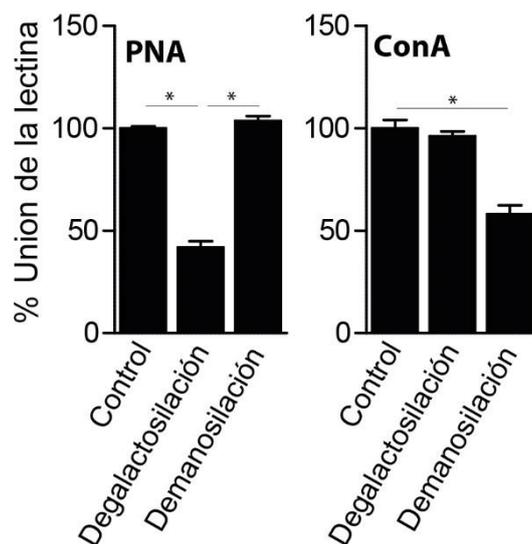


**Figura 4.7. Estudio del reconocimiento de la lactoferrina demanosilada o control por parte de los receptores DC-SIGN y Receptor de Manosa.** Se realizó un ensayo tipo ELISA para estudiar la capacidad de los receptores DC-SIGN y el MR de reconocer la lactoferrina antes y después del tratamiento con la  $\alpha$ -manosidasa. Para ello, la fracción que presenta las (glico)proteínas obtenidas luego de la gel filtración fue sensibilizada (1  $\mu$ g/mL) en placas de ELISA para posteriormente incubar con las proteínas quiméricas CLR-Fc y detectar con un anticuerpo anti-hIgG conjugado a peroxidasa. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0.05$ ).

Interesantemente, se ha reportado que la lactoferrina puede interactuar con el receptor DC-SIGN presente en células dendríticas, siendo incluso capaz de inhibir la infección de estas últimas por el virus de inmunodeficiencia humana [176]. Por lo tanto, si bien las condiciones de demanosilación pueden ser mejoradas, el derivado inmovilizado de la  $\alpha$ -manosidasa fue capaz de inducir cambios en el perfil de glicosilación de glicoproteínas que pueden ser relevantes desde un punto de vista biológico.

### Deglicosilación de FhTE

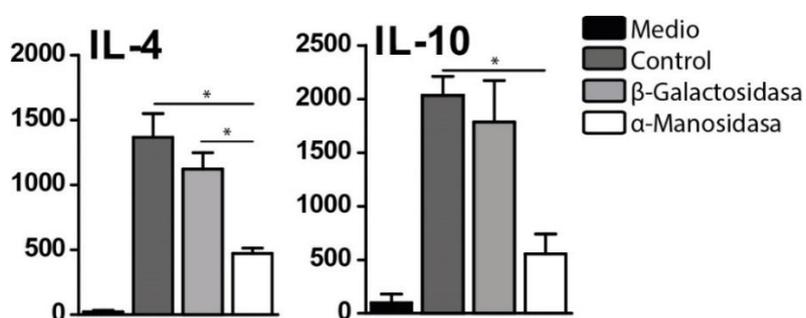
Como se detalla en el capítulo anterior, nuestros resultados muestran un rol de los glicanos de *Fasciola hepatica* en la modulación de células dendríticas murinas y sugieren la participación de receptores que reconocen manosa. La demanosilación enzimática surge como una alternativa prometedora para confirmar el rol de las manosas en dicho proceso, por lo que se procedió a la utilización de nuestros derivados inmovilizados sobre nanopartículas, en las mismas condiciones utilizadas para las glicoproteínas modelo, salvo que se realizaron a pH 6,5 dado que FhTE precipita a pH menores. La deglicosilación del lisado parasitario fue evaluada por reconocimiento de las lectinas PNA y ConA, las cuales se sabe que pueden reconocer el lisado parasitario (Figura 3.3A).



**Figura 4.8. Estudio de reconocimiento de los diferentes extractos parasitarios con diferente perfil glucídico por PNA y ConA.** El reconocimiento de FhTE por parte de las lectinas PNA y ConA antes y después del tratamiento con las enzimas inmovilizadas sobre nanopartículas magnéticas se llevó a cabo mediante un ensayo tipo ELISA, en el cual se sensibilizó placas con FhTE (1  $\mu$ g por pocillo), para posteriormente incubar con las lectinas biotiladas y streptavidina-HPR. Como control se utilizó FhTE incubado con nanopartículas sin enzimas inmovilizadas. En éste caso, se realizó la cuantificación de proteínas luego del proceso de deglicosilación mediante el método de Bradford, dado que los glicanos liberados podrían interferir en el ensayo de BCA. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0.05$ ).

En la Figura 4.8 se puede observar que una pérdida de reconocimiento de PNA únicamente cuando el extracto es tratado con el derivado de la  $\beta$ -galactosidasa, pero no con la  $\alpha$ -manosidasa. De modo opuesto ocurre con el reconocimiento de ConA, el cual disminuyó únicamente por tratamiento con el derivado inmovilizado de la  $\alpha$ -manosidasa. Estos resultados muestran la fina especificidad de las enzimas glicosidasas utilizadas, y como la inmovilización no afecta dicha característica.

Estos resultados son prometedores y motivan a la evaluación biológica de los diferentes extractos parasitarios con un perfil glucídico diferente. En particular, nuestros resultados sugieren que los glicanos de FhTE participan en la modulación de células dendríticas al aumentar la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y disminuir citoquinas pro-inflamatorias IL-12 e IL6. Asimismo, como se demostró en el capítulo anterior, los glicanos de FhTE estarían involucrados en la capacidad de dichas células dendríticas de inducir respuestas inmunes de tipo Th2 modificada, en particular mediante la modulación de las citoquinas IL-4 e IL-10 por parte de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.



**Figura 4.9. Capacidad de inducir respuestas tipo Th2 modificadas en linfocitos T CD4 de ratones infectados por parte de BMDCs cargadas con extractos parasitarios con diferente perfil glucídico.** Las BMDCs fueron incubadas por 16 horas con los extractos tratados o no con los derivados inmovilizados de  $\alpha$ -manosidasa y  $\beta$ -galactosidasa. Como control, se utilizaron BMDC incubadas únicamente con medio de cultivo. Pasado ese tiempo, las células fueron lavadas e incubadas con linfocitos T CD4 purificados de ratones infectados por 72 horas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0.05$ ).

Para evaluar el papel inmunomodulador de galactosas y manosas terminales presentes en los componentes de *F. hepatica*, se analizó la capacidad de los diferentes extractos de modular la maduración de células dendríticas y su capacidad de inducir la producción de las citoquinas IL-4 e IL-10 por linfocitos de animales infectados. Si bien no se encontró diferencia en la modulación de la maduración de células dendríticas murinas (resultados no mostrados), se encontró que el tratamiento con manosidasa, pero no el de galactosidasa, reduce su capacidad de inducir respuestas tipo Th2 modificada por los linfocitos T CD4 de animales infectados, reduciendo la producción de IL-4 e IL-10 (Figura 4.9).

## Discusión

El trabajo que se describe en el presente capítulo permitió lograr la inmovilización de dos exoglicosidasas de interés glicobiológico:  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y  $\alpha$ -manosidasa de *Canavalia ensiformis*. Para ello, se utilizaron dos soportes diferentes: agarosa (clásicamente utilizado en la inmovilización de proteínas) y nanopartículas de sílica magnéticas (un soporte novedoso). Se logró la inmovilización de ambas enzimas con buena actividad y buenos rendimientos de inmovilización utilizando la máxima capacidad del soporte para aceptar la enzima. Asimismo, se logró reutilizar ambos derivados enzimáticos sin perder la capacidad de deglicosilar las glicoproteínas modelo.

Interesantemente, la  $\beta$ -galactosidasa no pierde actividad al ser inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas, ya que no se observan diferencias significativas entre el rendimiento evaluado en base a la actividad enzimática comparado con el evaluado en base a proteína. Sin embargo, esto no fue de la misma forma para la  $\alpha$ -manosidasa, donde se obtuvo un menor rendimiento de inmovilización de la actividad enzimática comparado con el de proteína. Estos datos sugieren que podría haber una inactivación parcial de la enzima debido al proceso de inmovilización o bien problemas disfuncionales que llevan a subestimar la actividad enzimática del derivado inmovilizado. Las diferencias en los rendimientos de inmovilización de actividad enzimática podrían estar relacionados con las diferencias estructurales de las enzimas. Mientras la  $\beta$ -galactosidasa es una enzima monomérica con un peso molecular relativamente bajo (105 kDa), la  $\alpha$ -manosidasa es una enzima tetramérica, compuesta por dos tipos de subunidades de 44 kDa y 66 kDa. Asimismo, las lisinas expuestas en la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae*, cuyas  $\epsilon$ -aminas son propensas a reaccionar con los grupos cianato-éster del soporte activado, se encuentran relativamente lejos del sitio activo de la enzima [177]. Desafortunadamente, la estructura cristalográfica de la  $\alpha$ -manosidasa de *C. ensiformis* no se encuentra disponible, y por lo tanto, tampoco la distribución de los aminoácidos en el espacio. Sin embargo, se han reportado algunos indicios en relación a la presencia de lisinas o bien en el sitio activo o en regiones cercanas al mismo [178]. La inmovilización a través de estas lisinas podría ser la responsable de una modificación en la estructura del sitio activo generando inactivación parcial. También podría ocurrir que la enzima se inmovilizara de forma tal que el sitio activo quedara enfrentado a la superficie del soporte quedando el acceso al mismo parcialmente ocluido lo que podría generar problemas difusionales. Por otro lado, el mayor peso molecular de la  $\alpha$ -manosidasa implica que la misma ocupa mayor parte de la superficie del soporte aumentando

la densidad de proteína por área superficial del soporte en relación a la  $\beta$ -galactosidasa, para el mismo número de moléculas, contribuyendo al incremento de potenciales efectos difusionales.

Una de las ventajas de utilizar estrategias de inmovilización covalente es que no existe liberación de la enzima del soporte, fenómeno conocido como leakage. A los efectos de verificar que no se produce liberación de enzima durante su utilización, se incubaron las enzimas inmovilizadas con el buffer de almacenamiento correspondiente durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, se separó la enzima inmovilizada del buffer y se analizaron los sobrenadantes mediante electroforesis desnaturizante (SDS- PAGE) no observándose liberación de ninguna de las enzimas (datos no mostrados).

Los derivados inmovilizados sintetizados fueron capaces de deglicosilar específicamente tanto glicoproteínas modelo como un extracto de *F. hepatica*, lo que se observa en una pérdida en el reconocimiento de los mismos por las lectinas ConA y PNA. Asimismo, las glicoproteínas deglicosiladas y el extracto deglicosilado pudieron ser utilizadas con éxito en estudios biológicos, ya sea por análisis del reconocimiento por parte de receptores del sistema inmune, como DC-SIGN y el MR, como a través del estudio de la capacidad de BMDCs cargadas con diferentes extractos deglicosilados de *F. hepatica* de inducir respuestas tipo Th2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de ratones infectados. La participación de los residuos de manosa en el desarrollo de respuestas Th2 podría darse en diferentes niveles. En primer lugar, residuos de manosa podrían interactuar con receptores específicos en la superficie de células dendríticas (como DC-SIGN o el MR), induciendo señalización que conduce a una regulación de la capacidad estimuladora de éstas. Por otro lado, estructuras manosiladas podrían además ser necesarias para la internalización por las células dendríticas de glicoproteínas que presenten péptidos inmunodominantes, es decir, aquellos que sean más efectivos en el desarrollo de respuestas inmunes. En este sentido, el MR es conocido por su gran capacidad endocítica [179]

Si bien nuestros resultados muestran un uso prometedor de las glicosidasas inmovilizadas en el estudio glicobiológico, en ningún caso se llegó a obtener evidencia de una deglicosilación total. Para el caso de la  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada, se logró una pérdida parcial de reconocimiento con PNA (cerca del 50%, tanto en la asialofetuina como en el extracto de *F. hepatica*). Existen algunos puntos a considerar al interpretar estos resultados. Dicha lectina es específica para  $\beta$ -galactosa terminal, reconociendo principalmente la estructura Gal  $\beta$ 1-3 GalNAc (antígeno T), aunque también puede reconocer Gal  $\beta$ 1-4 GalNAc [180]. Por otra parte, la  $\beta$ -galactosidasa de *A. Oryzae* ha sido reportada como específica para enlaces  $\beta$ 1-4, por lo que no podría hidrolizar

al antígeno T, el que continuaría siendo reconocido por la lectina PNA. También se podrían realizar estudios de espectrometría de masa para evaluar los cambios generados en la composición de los glicanos como consecuencia de los procesos de deglicosilación.

Por otro lado, también se obtuvo una deglicosilación parcial con la  $\alpha$ -manosidasa. En éste caso, el estudio de espectrometría de masa nos muestra que efectivamente no se lograron hidrolizar todas las manosas presentes en la proteína modelo (lactoferrina), sino que el tratamiento con la enzima conduce a una menor complejidad de los N-glicanos que presentan oligomanosa. Esto concuerda con los resultados de reconocimiento por la lectina ConA. A pesar de ello, es interesante notar que el tratamiento es capaz de inducir una diferencia en el reconocimiento por el receptor DC-SIGN. En cuanto a la deglicosilación de un extracto de *Fasciola hepatica*, se logró también una pérdida parcial del reconocimiento por la lectina ConA, a pesar de trabajar a un pH superior al óptimo para la enzima.

A los efectos de mejorar la deglicosilación utilizando los derivados inmovilizados, habría que evaluar que parámetros del proceso serían viables de ser modificados de forma de optimizar el funcionamiento de ésta herramienta. Es deseable encontrar un compromiso entre las condiciones en las cuales la enzima es más eficiente y estable y las condiciones de estabilidad de las potenciales glicoproteínas sustrato. Esto se torna aún más complejo cuando se plantea el uso de las enzimas inmovilizadas para el estudio glicómico de extractos proteicos de diferente origen.

Entre los parámetros a considerar se encuentra la **temperatura**. Si bien, la  $\beta$ -galactosidasa y la  $\alpha$ -manosidasa presentan temperaturas óptimas superiores a la ambiente (50°C y 45°C respectivamente) las mismas nos son estables en esas condiciones por largos períodos de tiempo. La  $\alpha$ -manosidasa soluble presenta una pérdida de actividad de un 20 % al cabo de 2 horas de incubación a su temperatura óptima y pH 11-12 y de un 50% al cabo de 3 hs a 28°C y pH 5,5 [178]. A su vez la vida media de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* a 60°C es de 2 hs [181]. Por otra parte, es difícil encontrar proteínas con buena estabilidad térmica por períodos prolongados a temperaturas superiores a los 40°C. Por lo cual es probable que las potenciales glicoproteínas sustratos tampoco sean estables durante 24 hs a las temperaturas óptima de estas enzimas. Lo anterior nos lleva a concluir que trabajar a temperatura ambiente continúa siendo la mejor opción. Otro parámetro a considerar es el **pH**. Con las glicoproteínas modelo se trabajó al pH óptimo en ambas enzimas, por lo cual la modificación de este parámetro no mejoraría los resultados del proceso de deglicosilación. Incluso debido a las características del lisado parasitario fue necesario trabajar a un pH superior al óptimo de las enzimas para evitar la

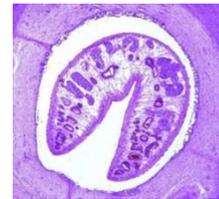
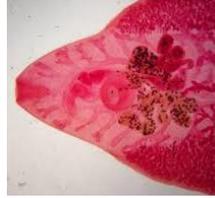
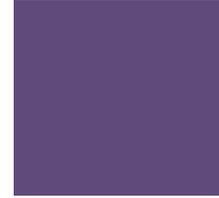
precipitación del mismo. Esto pone de manifiesto que el pH de la deglicosilación va a estar pautado por las condiciones de estabilidad de la glicoproteína o muestra biológica a deglicosilar.

La **relación de unidades de enzima/ mg de glicoproteína sustrato** es otro factor que debe ser considerado. Seguramente si se aumenta la relación U de glicosidasa/mg de proteína se puede lograr un aumento en la eficiencia de la deglicosilación. De hecho, en el caso del lisado la relación U de enzima/mg de glicoproteína sustrato utilizada es mayor que la utilizada con las glicoproteínas modelo. Para el proceso de degalactosilación se utilizaron 2.3 UE de  $\beta$ -galactosidasa por mg de asialofetina y 14 U de  $\beta$ -galactosidasa por mg de lisado. Por otro lado, para la demanosidación se utilizaron 0,2 U de  $\alpha$ -manosidasa por mg de lactoferrina y 0,5 UE de  $\alpha$ -manosidasa por mg de lisado. Si se tiene en cuenta que no todas las proteínas del lisado son sustrato de las glicosidasas utilizadas esa relación se hace aún mayor a favor del lisado. Como se mencionó anteriormente la deglicosilación del lisado se realizó a un pH más desfavorable. Sin embargo, los porcentajes de pérdida de reconocimiento por las lectinas específicas fueron similares a los obtenidos para las glicoproteínas modelo. Esto pone de manifiesto que ese aumento de la relación U de glicosidasa por mg de glicoproteína compensó las condiciones desfavorables para la glicosidasa. Esto hace que la modificación de este parámetro sea un aspecto a considerar a los efectos de mejorar los resultados de la deglicosilación. Por otra parte, el hecho de que la glicosidasa pueda ser reutilizada hace que el costo de la misma no sea un problema. Otro aspecto a considerar sería el **tiempo**. En este trabajo se seleccionó un tiempo de 24 hs como un tiempo “razonable” para que la enzima pueda actuar, aunque cabe la posibilidad que sea necesario trabajar a tiempos más prolongados.

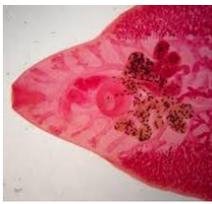
Finalmente se debe considerar el **impedimento estérico** que puede surgir debido al carácter macromolecular de los sustratos, en este caso, las glicoproteínas. Es probable que esto sea parte de la causa por la cual es más difícil la hidrólisis de las manosas más cercanas a la estructura de la proteína. Una alternativa frecuentemente utilizada es la desnaturalización de la glicoproteína sustrato como forma de exponer las estructuras oligosacáridicas y facilitar su hidrólisis. Sin embargo, esto destruye la estructura proteica de la enzima no pudiendo utilizar la glicoproteína deglicosilada para ensayos biológicos posteriores, lo cual es de sumo interés para esta tesis. La inmovilización de la glicosidasa puede aumentar aún más este problema, pero trabajar con la enzima soluble implicaría la dificultad de utilizar diferentes técnicas cromatográficas para remover la enzima del sustrato/s, lo cual es aún más complejo cuando se trabaja con un lisado proteico.

En suma, se desarrolló la inmovilización de dos glicosidasas de interés capaces de deglicosilar tanto proteínas modelo como complejas mezclas proteicas, si bien el proceso de deglicosilación puede ser mejorado. Nuestros resultados muestran que las mismas son herramientas interesantes para el estudio del rol de glicanos.

**Capítulo V: *Fasciola hepatica*  
modula células dendríticas a  
través de DC-SIGN**







## **Introducción**

DC-SIGN, un receptor específico para glicanos fucosilados o con alto contenido de manosa [85], es capaz de interactuar con glicanos de una gran variedad de patógenos [88-94], entre los que se encuentran algunos parásitos helmintos como *Schistosoma mansoni* [70, 97, 98] o *Trichuris suis* [82]. Se expresa en una variedad de células dendríticas, incluyendo las derivadas de monocitos y células CD34<sup>+</sup>, al igual que células dendríticas dermales en la piel y células dendríticas inmaduras tanto en sangre periférica como tejidos linfoides.

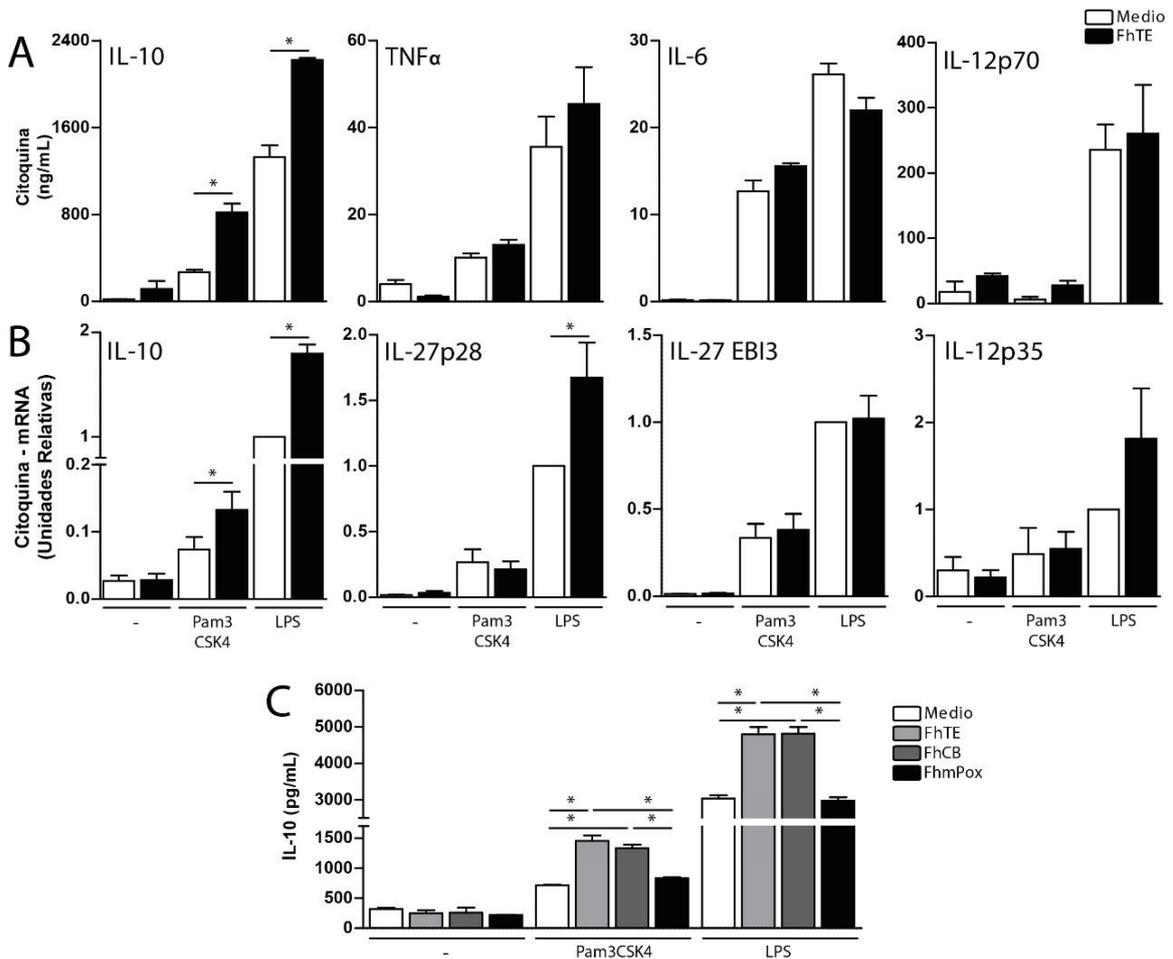
Cuando DC-SIGN interactúa con patógenos, desencadena una señalización específica que modula la actividad de las células dendríticas en varios niveles, influyendo la fagocitosis [182], suprimiendo la maduración inducida por TLR [82], internalizando moléculas derivadas de patógenos [70], modificando la adhesión y migración de células dendríticas [183], la presentación de antígeno [184-186] y la regulación de la activación de linfocitos T por células dendríticas [89, 92]. Interesantemente, se ha reportado recientemente que componentes de parásitos helmintos, como *F. hepatica*, pueden interactuar con DC-SIGN y desencadenar vías de señalización específicas que promueven la diferenciación de células T a linfocitos T colaboradores foliculares [92]. De todas formas, a pesar de que los autores asumen que estos procesos son dependientes de fucosa, la identidad de los glicanos inmunomoduladores no ha sido investigada.

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos en el estudio de las propiedades inmunomodulatorias de glicanos de *F. hepatica* sobre células dendríticas humanas. Éstos muestran que las estructuras glucídicas del parásito inducen un aumento en la producción de IL-10 e IL-27p28 inducida por ligandos de TLR. Estas propiedades inmunomodulatorias de los carbohidratos son mediadas por su interacción con DC-SIGN, que reconoce tanto manosa como fucosa presente en el lisado parasitario. Además, los glicanos parasitarios mediante su interacción con DC-SIGN inducen propiedades regulatorias en las células dendríticas humanas, que disminuye la proliferación alogénica de células T. Finalmente, se muestra que un homólogo murino de DC-SIGN, CD209a, limita la producción de IL-12/23p40 por BMDCs, pero no participa en su capacidad estimuladora de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

**Resultados**

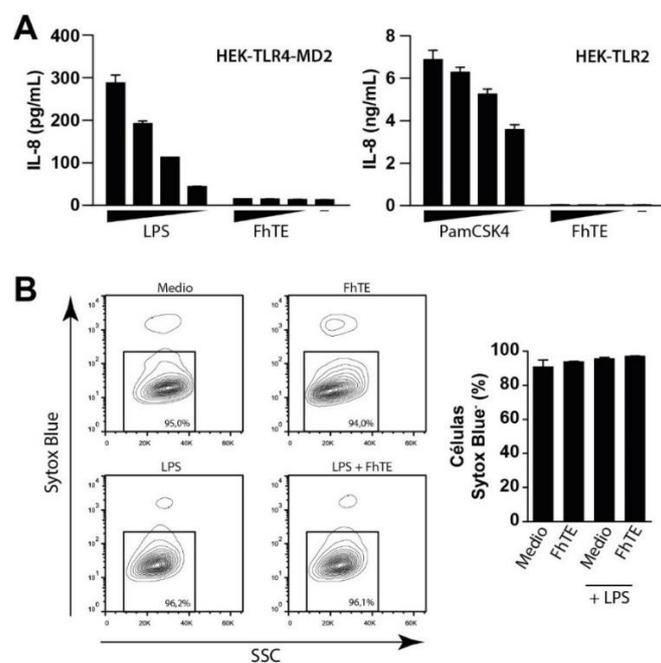
*DC-SIGN internaliza glicoconjugados de F. hepatica y media un aumento en la producción de IL-10 e IL-27p28 por células dendríticas humanas estimuladas por ligandos de TLR*

En primer lugar, se evaluó si los componentes de *F. hepatica* son capaces de modular la producción de citoquinas por células dendríticas humanas luego de un estímulo de maduración.



**Figura 5.1. Los glicoconjugados de *F. hepatica* potencian la producción de IL-10 por células dendríticas estimuladas con ligandos de TLR.** A) Los niveles de las citoquinas IL-6, IL-10, TNFα e IL-12p70 fueron determinados por ELISA en sobrenadantes de moDCs estimuladas con Pam3CSK4 o LPS en presencia o ausencia de FhTE por 18 horas. B) Alternativamente, la expresión de IL-10, IL-27p28, IL-27EBI3 e IL-12p35 fue determinada por qRT-PCR luego de 5-6 horas de estimulación. Los resultados se expresan de forma relativa a moDCs estimuladas únicamente con LPS, el cual se tomó como 1. C) moDCs fueron estimuladas al igual que A, en presencia de FhTE, FhCB o FhmPox. Luego de 18 horas, se midió la producción de IL-10 en el sobrenadante de cultivo. Un resultado representativo de cuatro experimentos independientes es mostrado (±SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\*p < 0.05).

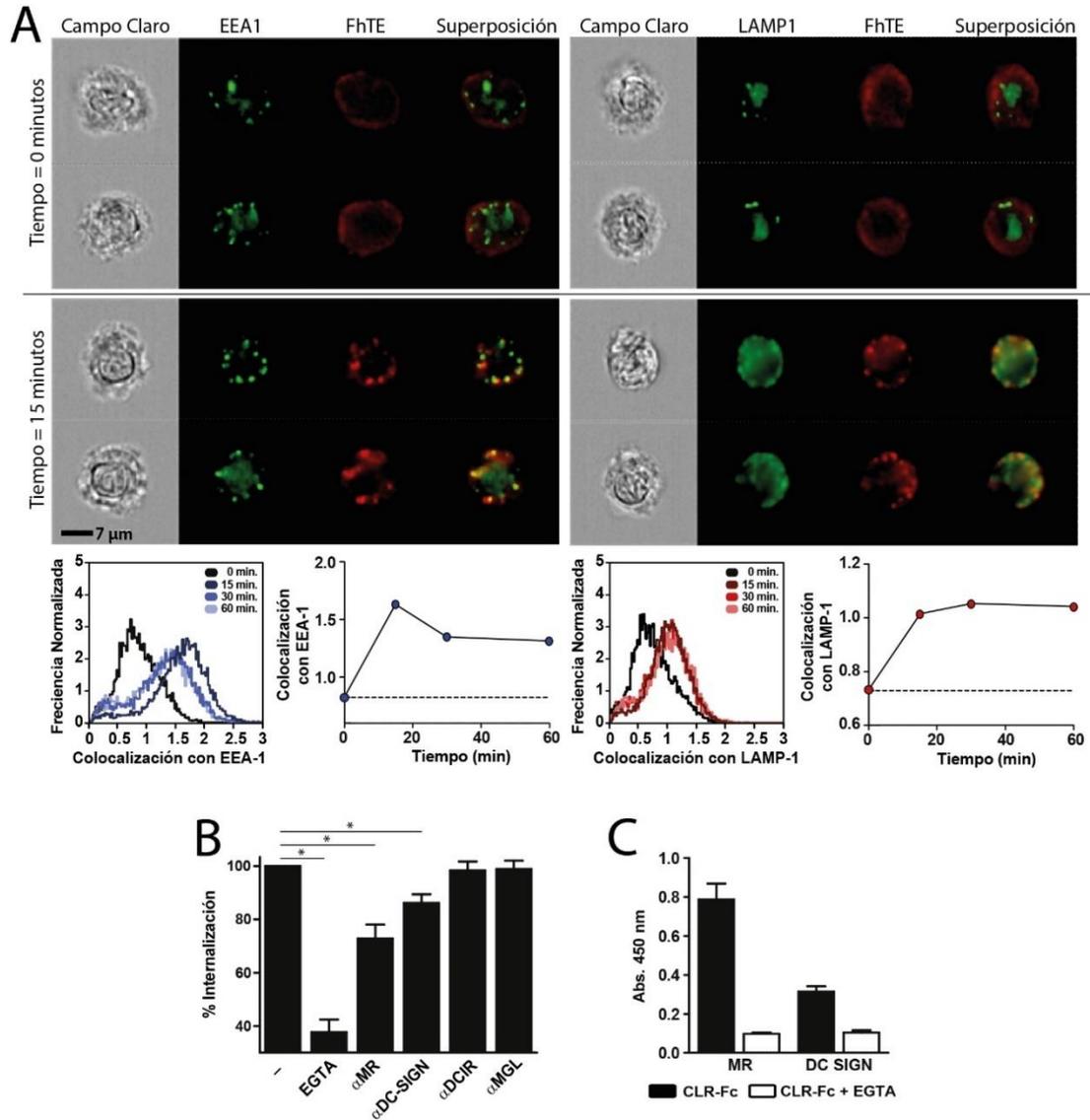
Con esta finalidad se cultivaron células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs) con FhTE en presencia o ausencia de Pam3CSK4 o LPS (ligandos de TLR2 y TLR4, respectivamente), y se evaluó la producción de diferentes citoquinas en el medio de cultivo o a través de qRT-PCR. A pesar de que FhTE no indujo por sí solo la expresión de citoquinas por moDCs, cuando se agregó en conjunto con un estímulo de maduración, condujo a un aumento en la producción de IL-10 e IL-27p28 (Figura 5.1A y B). Interesantemente, este aumento en la producción de IL-10 fue abolido cuando los glicanos fueron oxidados con m-periodato de sodio (FhmPox) (Figura 5.1C). Es importante notar aquí que FhTE no afectó la viabilidad de las moDCs, ni tampoco fue capaz de señalizar a través de los TLR2 y TLR4 (Figura 5.2Ay B).



**Figura 5.2. FhTE no señaliza a través de TLR4 o TLR2, al igual que no afecta la viabilidad de las moDCs.** A) Células HEK transfectadas con TLR2 o TLR4 y MD2 humanos se incubaron con FhTE para estudiar si éste puede inducir señalización a través de estos receptores. Para ello,  $10^5$  células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de FhTE (200, 100 o 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o de los controles positivos para cada TLR, Pam3CSK4 (TLR2, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o LPS (TLR4 20  $\text{ng}/\text{mL}$  a 1  $\text{ng}/\text{mL}$ ). Posteriormente, el contenido de IL-8 fue analizado en los sobrenadantes de cultivo. B) Las moDCs fueron estimuladas con FhTE por 48 horas en presencia o ausencia de LPS y se estudió su viabilidad por citometría de flujo utilizando Sytox Blue.

Luego, se investigó si los componentes parasitarios podían ser internalizados por moDCs y se analizó cuál era la ruta intracelular que siguen al igual que los receptores que están involucrados, enfocándonos en los CLR. Para este fin, se conjugó FhTE con el fluorocromo ATTO633 y se estudió la ruta intracelular por citometría de flujo con análisis de imagen (ImageStream), utilizando anticuerpos específicos para compartimientos intracelulares como el antígeno de endosomas tempranos (EEA-1, por su sigla en inglés early endosomal antigen) y el marcador

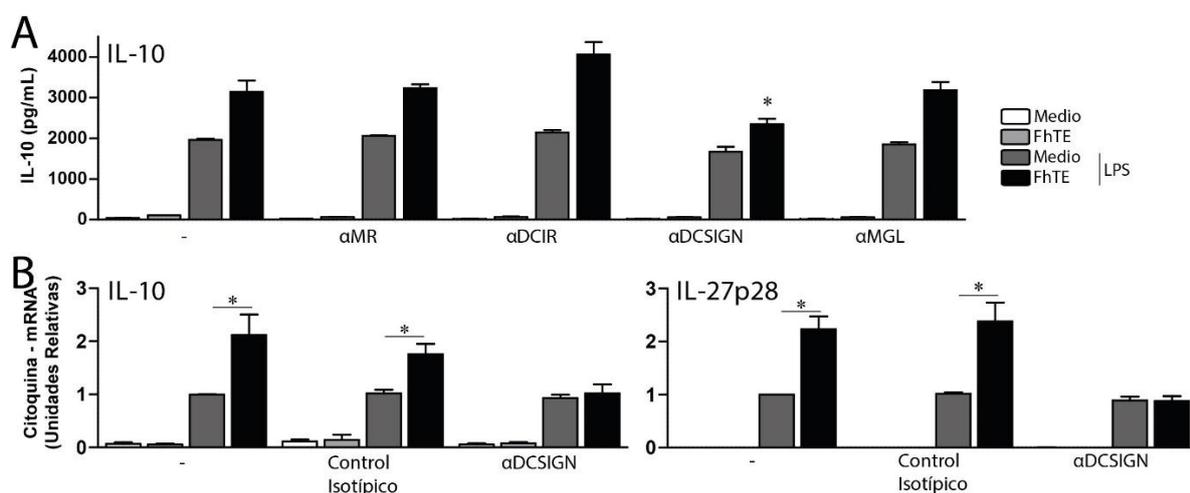
lisosomal LAMP-1. Como se muestra en la figura 5.3A, se evidenció un aumento de la colocalización de FhTE con los marcadores EEA-1 y LAMP-1 con el correr del tiempo, lo que sugiere que los componentes parasitarios son internalizados y llevados al endosomas temprano y al lisosoma.



**Figura 5.3. Los glicoconjugados presentes en FhTE son internalizados por el MR y DC-SIGN.** A) moDCs fueron incubadas con ATTO633-FhTE a diferentes tiempos (15, 30 o 60 minutos) a 37°C, luego del cual se fijaron con p-formaldehído 4%, permeabilizaron con saponina 0,1%, tiñeron con anticuerpos específicos para LAMP-1 o EEA-1 y finalmente, se analizaron por citometría con análisis de imágenes (ImageStream). Datos basados en al menos 10.000 células. B) Para evaluar la internalización de FhTE por moDCs, las células dendríticas fueron incubadas con FhTE conjugado a ATTO633 por 1 hora a 37°C o 4°C como control, en presencia de EGTA o anticuerpos bloqueantes específicos para los CLRs DC-SIGN, DCIR, MGL y MR. La internalización fue calculada como la diferencia entre la media de intensidad de fluorescencia (MFI) a 37°C y a 4°C. C) La unión del MR y DC-SIGN a FhTE fue evaluada en un ensayo tipo ELISA utilizando las proteínas quiméricas CLR-Fc en presencia o ausencia de EGTA. Un resultado representativo de tres (A) o cuatro (B y C) experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\* $p$  < 0.05).

La internalización de FhTE fue confirmada por citometría de flujo e inhibida por EGTA, sugiriendo la participación de CLR en éste proceso (Figura 5.3B). Además, la internalización fue inhibida por anticuerpos bloqueantes específicos contra el MR y DC-SIGN, mientras que no fue afectada cuando se utilizaron anticuerpos contra DCIR y MGL (Figura 5.3B). Finalmente, se evaluó la capacidad del MR y de DC-SIGN de reconocer FhTE mediante un ensayo tipo ELISA utilizando proteínas quiméricas compuestas del dominio de reconocimiento de carbohidratos de cada CLR, fusionado al fragmento constante de una inmunoglobulina humana [86, 187]. Los resultados que se muestran en la Figura 5.3C confirman la interacción de dichos CLR con FhTE, la cual es inhibida por el agente quelante EGTA.

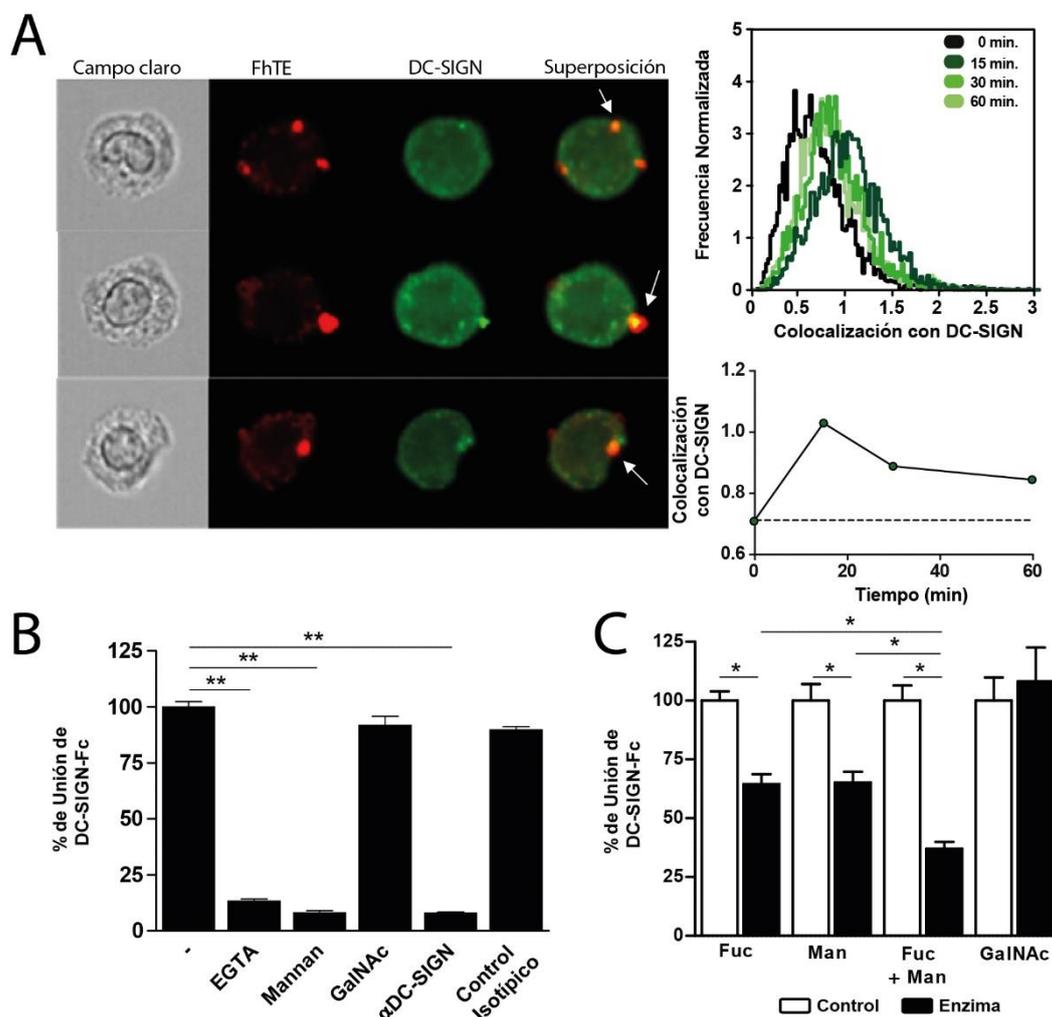
Dada la capacidad del MR y de DC-SIGN de reconocer e internalizar FhTE, se investigó si estos receptores pueden mediar el aumento de la producción de IL-10 e IL-27p28 por moDCs estimuladas por ligandos de TLR en presencia de FhTE. Para ello, moDCs fueron preincubadas con anticuerpos bloqueantes específicos contra los CLR: DC-SIGN, MR, DCIR y MGL. Como se puede observar en la Figura 5.4A y B, únicamente el anticuerpo anti-DC-SIGN fue capaz de restaurar significativamente el nivel de IL-10 inducido únicamente por LPS. Además, dicho anticuerpo fue también capaz de restaurar los niveles de IL-27p28 (Figura 5.4B), lo cual concuerda con lo reportado previamente [92].



**Figura 5.4. DC-SIGN potencia la producción de IL-10 e IL-27p28 por moDCs estimuladas con LPS.** Las moDCs fueron pre-incubadas con anticuerpos bloqueantes específicos para diferentes CLR, para luego ser estimuladas con FhTE en presencia o ausencia de LPS. La producción de IL-10 e IL-27p28 fue evaluada por ELISA (A) o qRT-PCR (B). Los resultados de qRT-PCR se muestran como cambio relativo respecto a moDCs tratadas sólo con LPS, cuya expresión fue definida como 1. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$  SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición en ausencia de anticuerpo bloqueante (A) o entre las condiciones indicadas (B) (\* $p < 0.05$ ).

*DC-SIGN interactúa con estructuras glucídicas de FhTE que presentan manosa y fucosa*

La interacción de FhTE con DC-SIGN se estudió utilizando citometría de flujo con análisis de imagen, donde se observó que el lisado marcado fluorescentemente colocaliza con dicho CLR en la superficie de las células dendríticas (Figura 5.5A). Dicha co-localización es mayor a los 15 minutos, lo cual podría deberse a que tanto DC-SIGN como FhTE se encuentran ya en los endosomas tempranos, por lo que hay una mayor concentración de los mismos.

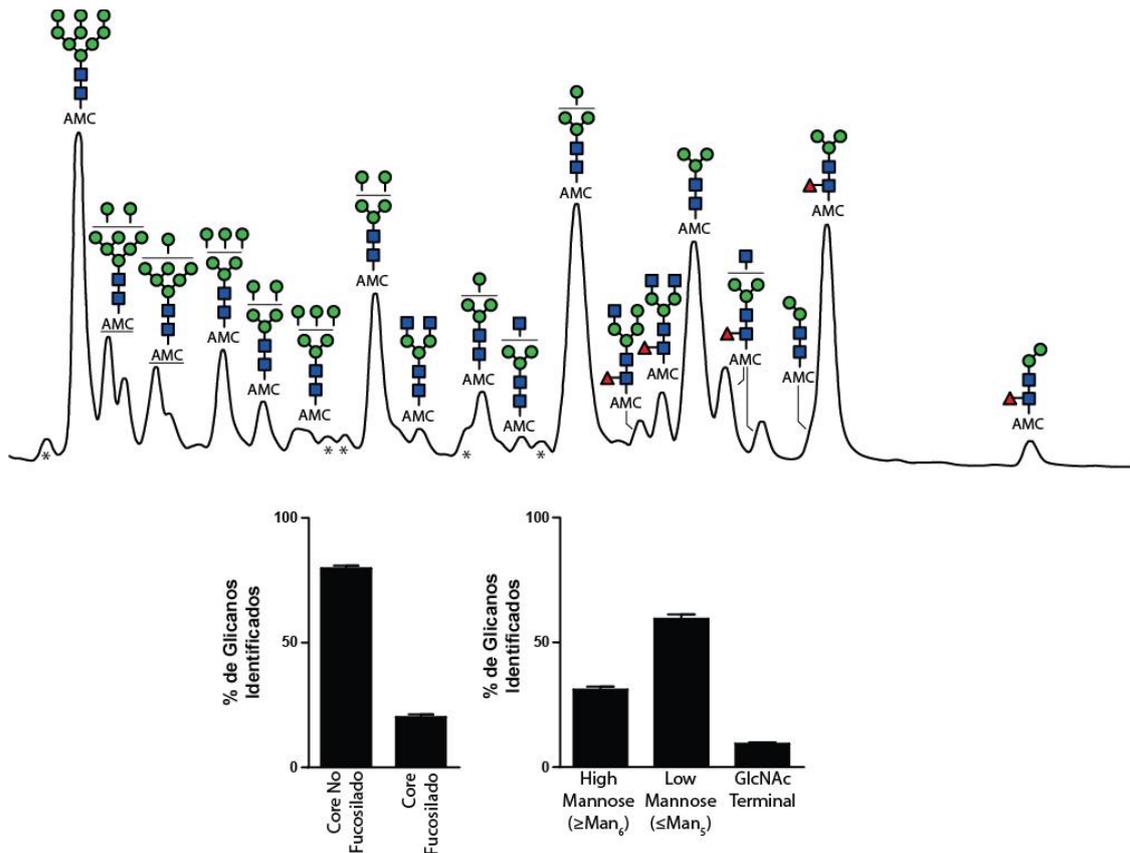


**Figura 5.5. DC-SIGN interactúa con estructuras glucídicas de FhTE que presentan manosa y fucosa.** A) Las oDCs fueron incubadas con ATTO633-FhTE a diferentes tiempos (15, 30 o 60 minutos) a 37°C, luego del cual se fijaron con p-formaldehído 4%, permeabilizaron con saponina 0,1%, tiñeron con un anticuerpo policlonal específico para la porción C terminal de DC-SIGN (CSRD) y finalmente, se analizaron por citometría con análisis de imágenes. Datos basados en al menos 10.000 células. B) Se realizaron ensayos de inhibición de la unión de DC-SIGN-Fc a FhTE preincubando dicho receptor con EGTA, mananos, GalNAc, un anticuerpo bloqueante específico o un control isotípico. C) La unión de DC-SIGN fue también evaluada en FhTE tratado previamente con las enzimas α-fucosidasa (Fuc), α-manosidasa (Man) o GalNAcasa (GalNAc). Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado (±SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\*p < 0.05).

Con el fin de caracterizar la estructura de los carbohidratos reconocidos por DC-SIGN, se realizaron ensayos de inhibición en la interacción con FhTE en un ensayo tipo ELISA. Como se esperaba, la interacción entre la proteína quimérica DC-SIGN-hFc y FhTE fue inhibida por EGTA, mananos y un anticuerpo bloqueante de DC-SIGN, mientras que no se observó inhibición con GalNAc o un control isotópico (Figura 5.5B). Considerando que DC-SIGN es capaz de reconocer tanto residuos carbohidratos de manosa como de fucosa [86], se evaluó la unión del mismo a extractos deglicosilados enzimáticamente, utilizando de forma soluble manosidasa, fucosidasas o ambos. Nuestros resultados muestran que el tratamiento de FhTE con cualquiera de las dos enzimas por separado induce una pérdida de reconocimiento por DC-SIGN, mientras que el tratamiento con ambas enzimas al mismo tiempo indujo una pérdida aún mayor (Figura 5.5C). Estos datos muestran que DC-SIGN es capaz de interactuar tanto con fucosa como con manosa presente en FhTE. El tratamiento con GalNAc de FhTE fue usado como control, no encontrándose cambios en la unión de DC-SIGN, como era esperado.

Como ya se mencionó anteriormente, es poca la información estructural respecto a los glicanos de *F. hepatica*. De hecho, no fue hasta este año que se reportó la presencia de estructuras oligomanosa en los N-glicanos presentes en glicoproteínas de un extracto de tegumento de parásitos adultos [188]. Sin embargo, los glicanos presentes en FhTE y sus diferencias (o no) con el extracto tegumentario aún no han sido descritas. Por ello, se procedió a realizar la identificación de los N-glicanos presentes en FhTE, mediante el tratamiento del mismo con PNGase F, la posterior purificación de los oligosacáridos y conjugación a un fluorocromo, para finalmente realizar la identificación por espectrometría de masa.

En la Figura 5.6 se muestra el perfil de elución de HPLC en fase normal de los glicanos neutros obtenidos de FhTE y la cuantificación realizada en base al área de cada estructura. Al igual que lo reportado anteriormente, se observó que FhTE contiene una gran cantidad de estructuras manosiladas, aunque también se pueden encontrar estructuras con GlcNAc terminal en menor proporción. Asimismo, si bien se observa fucosa presente en los N-glicanos, ésta se encontraba en el core por lo cual no representaría un ligando potencial de DC-SIGN. Estos datos confirman la presencia de N-glicanos con alto contenido en manosa que pueden ser reconocidas por DC-SIGN, lo cual concuerda con la pérdida de interacción entre dicho CLR y FhTE luego del tratamiento de éste último con una manosidasa. Sin embargo, no se encontraron ligandos putativos de DC-SIGN que contengan fucosa, lo que hace pensar que probablemente éstos se encuentren en O-glicanos o glicolípidos presentes en FhTE.

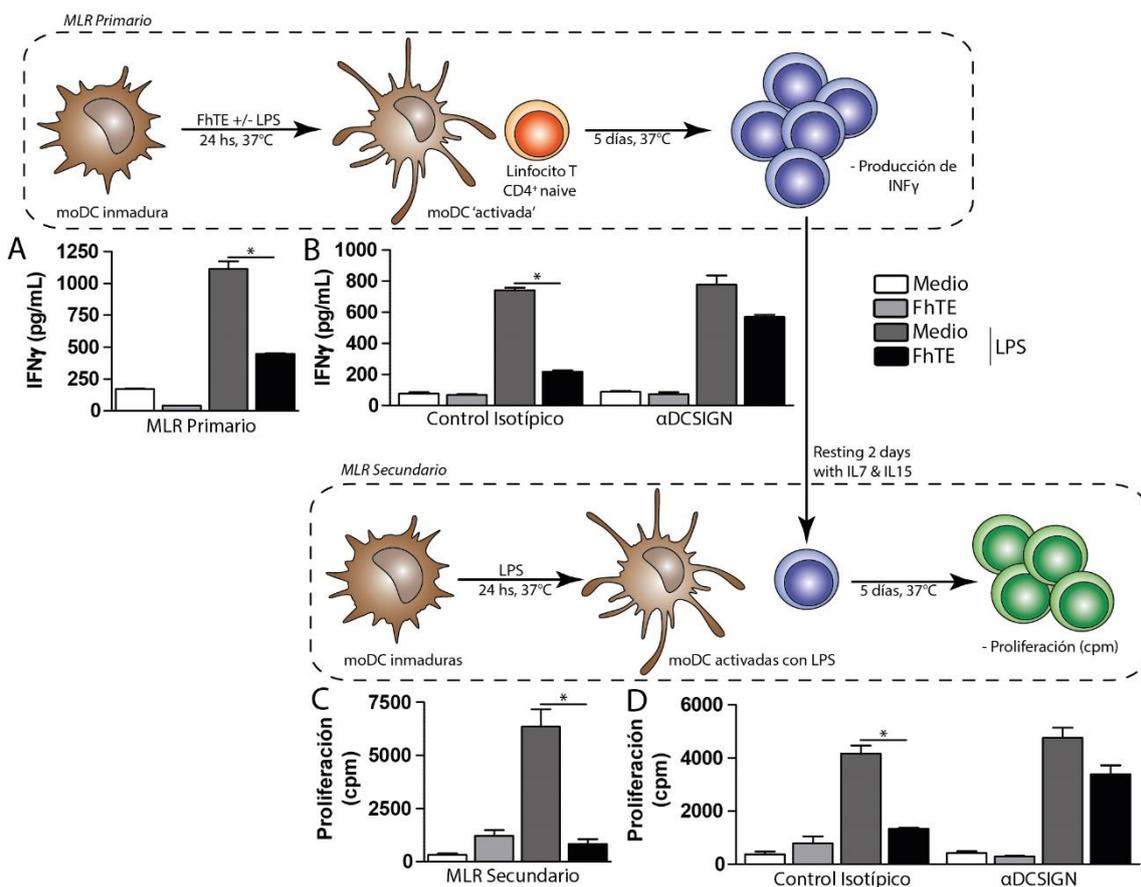


**Figura 5.6. N-Glicanos presentes en FhTE se caracterizan por un alto contenido en estructuras de manosa.** Para ello, los N-glicanos presentes en FhTE fueron obtenidos mediante tratamiento con la PNGasa F, para posteriormente purificarlos, conjugarlos al fluorocromo AMC y analizarlo mediante separación por HPLC y MS/MS. En la figura se muestra el cromatograma correspondiente a la separación por HPLC y las estructuras de cada pico que fueron identificadas luego del análisis de los datos de fragmentación en MS/MS. Asimismo, se muestra la cuantificación de las estructuras identificadas, realizada teniendo en cuenta el área de cada pico identificado. Los picos que presentan un \* representan estructuras que no coinciden con estructuras típicas de N-glicanos (no presentan el core Hex (HexNAc)<sub>2</sub> AMC), probablemente debido a la presencia de contaminantes en que fueron co-purificados con los N-glicanos.

*Glicocojugados de F. hepatica inducen células dendríticas regulatorias a través de DC-SIGN*

Para profundizar en el estudio de las propiedades inmunomoduladoras de FhTE sobre células dendríticas humanas, se analizó si el mismo era capaz de influenciar la capacidad estimuladora de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. De hecho, recientemente se ha reportado que la señalización a través de DC-SIGN en combinación con la de TLR4 induce un fenotipo tolerogénico sobre las células dendríticas, las cuales son capaces de inducir un fenotipo de anergia/regulatorio sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup> alogénicos [131].

Para ello, moDCs tratadas con FhTE, en presencia o ausencia de LPS, fueron co-cultivadas con linfocitos T CD4 de un donante distinto. Dado a que se co-cultivan células inmunes alogénicas (es decir, de una misma especie, pero diferentes genéticamente), los linfocitos T CD4 responderán a estas diferencias genéticas (principalmente, debido a diferencias a nivel de MHC), proliferando y produciendo citoquinas (principalmente IFN $\gamma$ ). Éste efecto es aún mayor cuando se realiza con moDCs maduras (por ejemplo, a través de ligandos de TLR, como el LPS), debido a que esto aumenta la expresión de MHCII, moléculas co-estimuladoras y citoquinas pro-inflamatorias, capaces de aumentar la activación de linfocitos T. Ésto es lo que se llama reacción mixta de leucocitos (MLR, por sus siglas en inglés Mixed Leukocyte Reaction) primario.



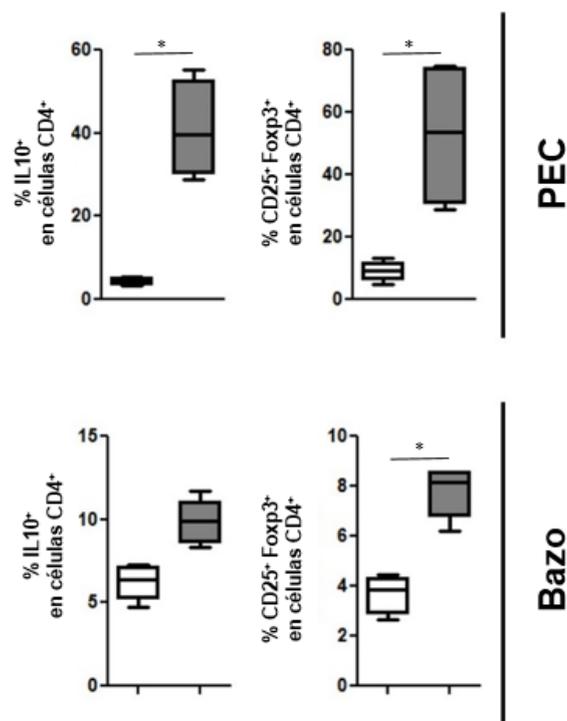
**Figura 5.7. FhTE es capaz de modular la capacidad de estimulación de moDCs.** A) moDCs fueron estimuladas durante 18 horas con FhTE en presencia o ausencia de LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), para luego ser co-cultivadas con linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive. Los niveles de IFN $\gamma$  fueron analizado por ELISA luego de 5 días. B) El mismo experimento descrito en A, fue realizado con moDCs pre-incubadas con anticuerpo bloqueante de DC-SIGN o el control isotípico correspondiente, previo a la estimulación con FhTE. C) Los linfocitos T estimulados en A se dejaron descansar durante 3 días en presencia de IL-7 e IL-15, para luego ser estimulados con moDCs del donante original previamente activadas con LPS. La proliferación de linfocitos T fue evaluada por incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina. D) Se procedió de igual forma con los linfocitos T estimulados en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante o su control isotípico. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\*p < 0.05).

Como se puede observar en la Figura 5.7, la producción de IFN $\gamma$  en estos MLR primarios se encuentra reducida cuando las moDCs estimuladas con LPS se incubaron en presencia de FhTE. Es más, este efecto inhibitorio se perdió cuando se utilizó un anticuerpo bloqueante de DC-SIGN, sugiriendo que FhTE regula la capacidad de estimulación alogénica de moDCs en un proceso mediado, al menos en parte, por DC-SIGN.

Luego, se investigó si los linfocitos producto del MLR primario son capaces de responder a una estimulación alogénica en un MLR secundario. Para ello, los linfocitos obtenidos luego de 5 días de un MLR primario, se lavaron, se contaron y se co-cultivaron con células dendríticas alogénicas previamente estimuladas con LPS, lo cual debería consistir en un estímulo que induzca proliferación en los linfocitos T CD4. Mientras que en un MLR primario se evalúa tanto la capacidad de las células dendríticas de inducir una respuesta alogénica como la capacidad de los linfocitos T CD4 de responder a ella, en un MLR secundario se evalúa únicamente a estos últimos. Nuestros resultados sugieren que las moDCs tratadas con FhTE en presencia de LPS son capaces de inducir un fenotipo regulatorio/anergia en linfocitos T CD4 durante en el MLR primario, que son incapaces de proliferar frente a un estímulo alogénico durante el MLR secundario. Interesantemente, este efecto fue abolido cuando se utilizó un anticuerpo bloqueante específico para DC-SIGN durante la primera estimulación, indicando que éste receptor juega un rol en la inducción de respuestas tolerogénicas por FhTE.

*La inhibición de IL-12/23p40 en BMDCs es mediada por CD209a, pero no así la producción de IL-10 ni su capacidad estimuladora de linfocitos T*

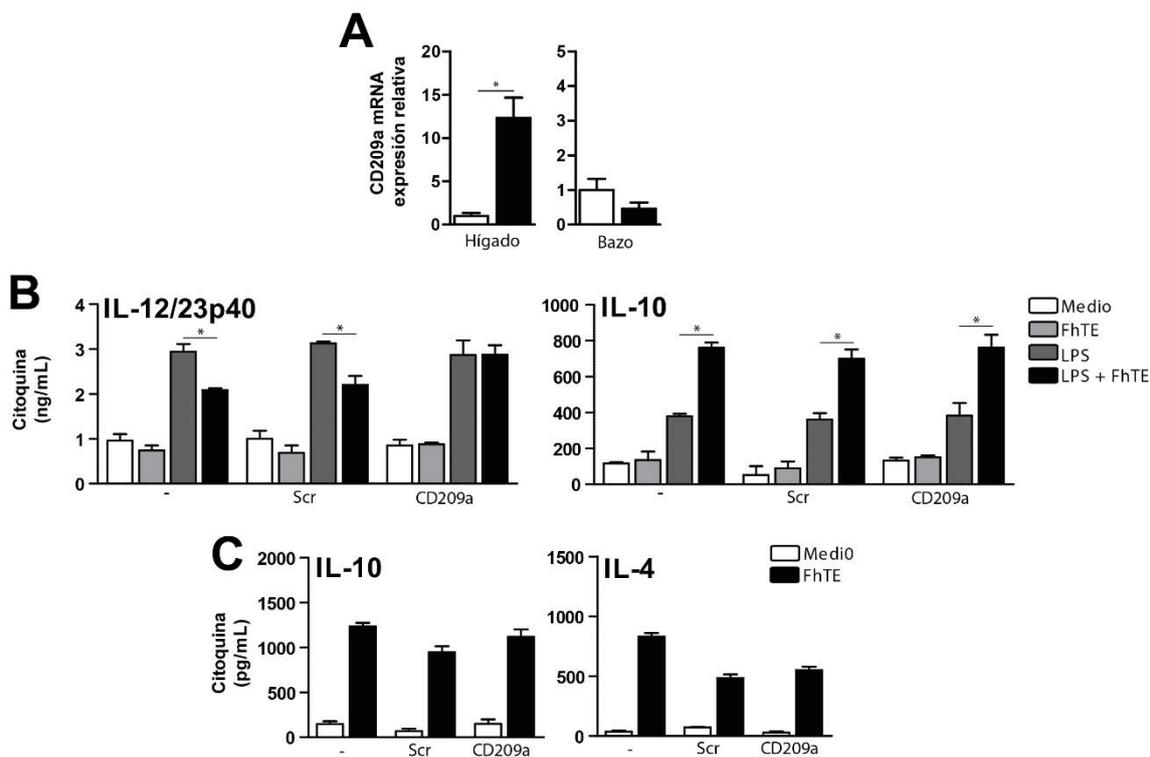
Estudiar el rol de DC-SIGN *in vivo* resulta una tarea compleja, al existir ocho homólogos de DC-SIGN en ratones, sin haber un claro homólogo funcional. Se ha reportado recientemente que CD209a (también conocido como SIGNR5) puede inducir células T reguladoras vía producción de IL-10 [189], lo cual se asemeja a nuestros resultados con el DC-SIGN humano. Interesantemente, la infección por *F. hepatica* conduce a un aumento de células T reguladoras productoras de IL-10 (definidas como células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) (Figura 5.8). Por lo tanto, se decidió explorar el rol de CD209a en la modulación de la maduración de BMDCs.



**Figura 5.8. Infección por *F. hepatica* induce un aumento de células T reguladoras y productoras de IL-10 en bazo y peritoneo.** Ratones BALB/c fueron infectados con 15 metacercarias durante 3 semanas, para luego ser sacrificados y obtener el bazo y PECs. La expresión de Foxp3 e IL-10 en células CD4<sup>+</sup> y/o CD25<sup>+</sup> fue analizada por citometría de flujo. En gris se muestran animales infectados, en blanco animales control. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\* $p < 0.05$ ).

En primer lugar, se analizó la expresión de CD209a tanto en hígado como en bazo de animales infectados y no infectados. Los análisis por qRT-PCR mostraron que los hígados de animales presentan mayores niveles de expresión de CD209a que animales no infectados, mientras que no se detectaron diferencias en la expresión en bazo (Figura 5.9A).

Con el fin de evaluar a nivel funcional el rol de CD209a en la modulación de BMDCs por *F. hepatica*, se utilizó siRNA específicos para inhibir su expresión. Como se muestra en la Figura 5.9B, el silenciamiento de CD209a en BMDCs restaura la producción de IL-12/23p40, sin producir cambios en IL-10. Asimismo, para determinar los efectos de dicho receptor en la activación de linfocitos T CD4 por BMDCs tratadas con FhTE, se incubaron las mismas con linfocitos T CD4<sup>+</sup> de animales infectados para evaluar la producción de IL-4 e IL-10, citoquinas que se observó anteriormente son dependiente de la estructura de los glúcidos presentes de FhTE. En la Figura 5.9C se puede observar que la inhibición de CD209a no conduce a cambios en la producción de dichas citoquinas cuando se compara con el control de silenciamiento (Scr), indicando que dicho receptor no modifica la capacidad de BMDCs de activar linfocitos T CD4 específicos.



**Figura 5.9. El silenciamiento de CD209a restaura la producción de IL-12/23p40 por BMDC estimuladas con FhTE/LPS, pero no afecta la estimulación de linfocitos T.** A) La expresión de CD209a en hígados y bazo de animales infectados y animales control fue evaluada por qRT-PCR. B) siRNA fue utilizado para silenciar el receptor CD209a. Para ello, BMDCs fueron transfectadas por 24 horas con 10 nM de siRNA específico para CD209a, o su respectivo control, utilizando lipofectamina. Finalmente, la producción de IL-12p40 e IL-10 por dichas células luego de ser estimuladas por 18 horas con FhTE en presencia o ausencia de LPS. C) BMDCs tratadas como se indica en B, fueron co-cultivadas con linfocitos T CD4<sup>+</sup> de animales infectados, para luego de 3 días evaluar la producción de IL-10 e IL-4 por ELISA. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\* $p < 0.05$ ).

### Discusión

En este capítulo se muestran evidencias de que glicanos de *F. hepatica* modulan células dendríticas humanas a través de DC-SIGN, favoreciendo la inducción de linfocitos T reguladores o anérgicos. En particular, nuestros resultados evidencian que los glicanos parasitarios potencian la producción de IL-10 e IL-27p28. A pesar de que los glicoconjugados de *F. hepatica* pueden ser internalizados tanto por el MR como por DC-SIGN, la inmunomodulación de la maduración de células dendríticas por ligandos de TLR es mediada por DC-SIGN, pero no por el MR, DCIR o MGL, sugiriendo un rol principal de éste receptor en las propiedades de modulación de células dendríticas del parásito.

DC-SIGN es capaz de interactuar con un amplio rango de patógenos de gran impacto en salud pública, incluidos virus [89-91], bacterias [55, 93] y parásitos [70, 96-98] a través de estructuras fucosiladas (en particular los antígenos de Lewis) y glicanos de alto contenido de manosa, en un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  [190], aunque la interacción con parásitos helmintos ha sido reportada únicamente a través de glicanos fucosilados [98, 191]. Sin embargo, en el presente trabajo se observó que el reconocimiento de FhTE por DC-SIGN está mediado tanto por glicanos fucosilados como manosilados, dado que éste se pierde luego de tratar el lisado con exoglicosidasas específicas. De todas formas, la identificación de los N-glicanos presentes en FhTE reveló fundamentalmente la presencia de estructuras de oligomanosa, con ausencia de estructuras fucosiladas que sean ligandos putativos de DC-SIGN, por lo que éstas podrían estar presentes en O-glicanos o glicolípidos, por lo que la identificación de los mismos resulta de particular interés.

Interesantemente, se ha reportado recientemente que la señalización inducida por DC-SIGN depende de si el ligando es fucosilado o manosilado [89, 92, 192]. Mientras que la estimulación con estructuras glicosiladas que presentan fucosa conduce a un fenotipo inmuno-regulador caracterizado con un aumento de citoquinas anti-inflamatorias y una disminución de las pro-inflamatorias [87, 89], los glúcidos manosilados conducen a la activación de respuestas inmunes aumentando la síntesis de IL-10, IL-6 e IL-12 [87, 89, 92]. Nuestros resultados sugieren que DC-SIGN puede interactuar tanto con manosa como con fucosa, por lo que ambos procesos podrían estar conviviendo en nuestro sistema, resultando en un aumento de IL-10 e IL-27p28, sin observarse cambios en citoquinas pro-inflamatorias.

*Fasciola hepatica* es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedero por diferentes mecanismos, incluida la inmunomodulación y función de células dendríticas [55, 59, 193], resultando en una polarización Th2 modificada y en la inducción de respuestas regulatorias [53]. Aquí, se demostró que la interacción de glicanos presentes en *F. hepatica* con el receptor DC-SIGN es capaz de inducir propiedades reguladoras en células dendríticas, induciendo una mayor producción de las citoquinas IL-10 e IL-27p28. IL-10 es una molécula clave para la regulación del sistema inmune, que puede debilitar la proliferación, producción de citoquinas y capacidad de migración de linfocitos T [194], al igual que inducir anergia en éstos [195]. Por otro lado, IL-27 puede presentar tanto efectos estimuladores como supresores sobre respuestas inmunes. Interesantemente, IL-27 puede inducir la producción de IL-10 e inducir la diferenciación de células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) productoras de IL-10 [196]. En concordancia con nuestros resultados, la interacción de DC-SIGN con glicanos fucosilados resulta en una inducción de IL-

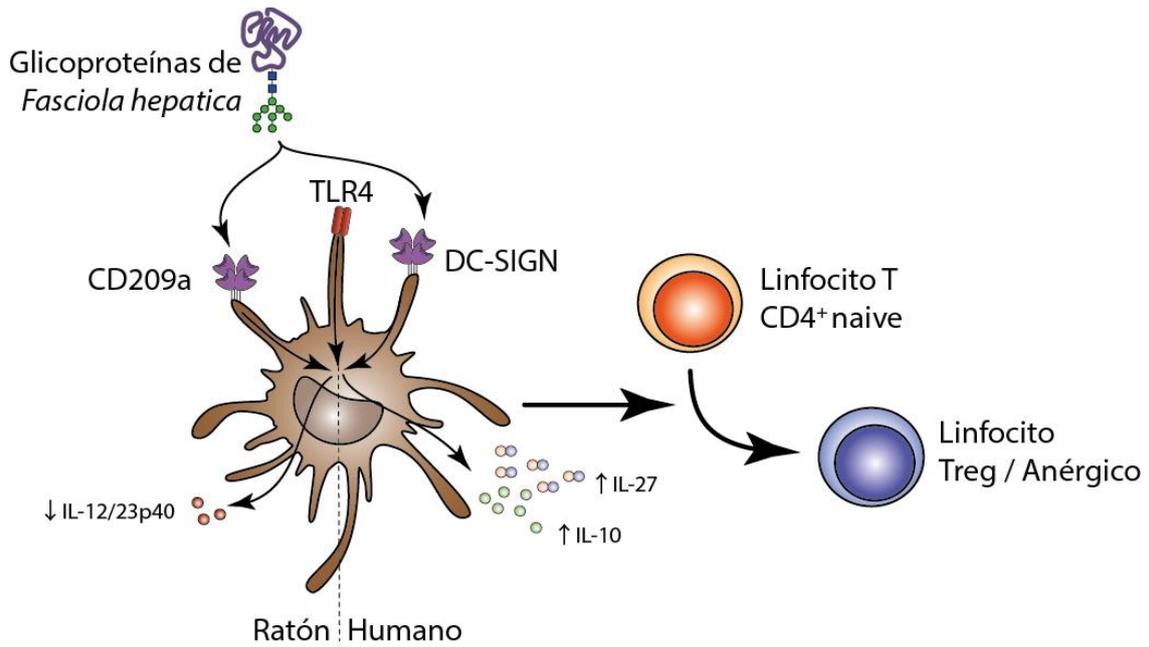
27p28 por células dendríticas, conduciendo a una subsiguiente polarización a linfocitos T colaboradores foliculares [92].

Para entender mejor como la interacción entre los glicanos de *F. hepatica* con DC-SIGN presente en células dendríticas puede alterar la activación de linfocitos T, se llevaron a cabo ensayos de MLR, tanto primarios como secundarios. Nuestros resultados muestran que el desencadenamiento de la señalización de DC-SIGN por glicanos de *F. hepatica* promueve un fenotipo regulador sobre las células dendríticas, capaces de disminuir la respuesta alogénica, tanto en un MRL primario como secundario, sugiriendo que estas células dendríticas son capaces de inducir anergia o un fenotipo regulatorio sobre células dendríticas.

Estos resultados concuerdan con los resultados reportados previamente, que muestran como la interacción de la glicoproteína mielina de oligodendrocitos (MOG, por su sigla en inglés myelin oligodendrocyte glycoprotein) con DC-SIGN en el contexto de activación simultánea de TLR4 resulta en un aumento de la secreción de IL-10 y también una inducción de anergia/fenotipo regulador en linfocitos T [131]. Asimismo, se ha reportado que glicanos de *H. pylori* pueden interactuar con DC-SIGN para inducir células dendríticas tolerogénicas, incapaces de inducir linfocitos T efectoras, polarizando los mismos a linfocitos T reguladores [197].

Interesantemente, CD209a, uno de los ocho parálogos genéticos de DC-SIGN en ratones, expresado en un subtipo de macrófagos, induce la secreción de IL-10 y media la diferenciación de linfocitos T reguladores cuando es estimulado con estructuras fucosiladas [189]. Sin embargo, en nuestro modelo, CD209a solamente medió la supresión de IL-12/23p40 cuando BMDCs son estimuladas con FhTE en presencia de LPS, sin modificar la capacidad del lisado parasitario de inducir IL-10. Debido a la existencia de diferentes homólogos murinos de DC-SIGN, resultaría interesante realizar un abordaje similar para cada uno de ellos, como forma de estudiar su rol en la capacidad de FhTE de modular la maduración de células dendríticas murinas. Alternativamente, se podrían utilizar anticuerpos bloqueantes para dichos receptores.

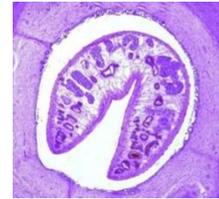
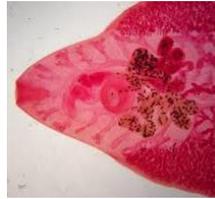
En conclusión, nuestro trabajo demuestra que glicanos de *F. hepatica* inducen un fenotipo tolerogénico en células dendríticas humanas vía interacción con DC-SIGN, y confiere a éstas la capacidad de inducir linfocitos T reguladores/anergia (Figura 5.10). A pesar de que no se confirmó el rol del homólogo murino CD209a durante la infección con el parásito, no se puede descartar que éste u otro homólogo murino de DC-SIGN pueda jugar un papel *in vivo* durante la infección y se deben llevar a cabo diferentes estudios para confirmar su rol (o no) en la inmunomodulación inducida por *F. hepatica*.



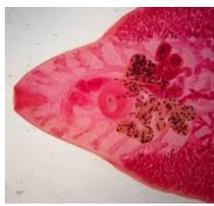
**Figure 5.10. Ilustración esquemática resumiendo los principales hallazgos del presente capítulo.** Glicoproteínas de *Fasciola hepatica* interactúan con y señalizan a través DC-SIGN presente en células dendríticas que, junto con la señalización por TLR, induce un aumento en la producción de las citoquinas IL-10 e IL-27. Asimismo, dichas células son capaces de inducir linfocitos T reguladores/anérgicos. Si bien no fue posible en esta tesis de determinar el rol *in vivo* en ratón, se observó que el silenciamiento de CD209a es capaz de reducir la inhibición en la producción de IL-12/23p40 que induce FhTE en BMDC estimuladas con LPS.



**Capítulo VI: Rol de MGL en la  
inmunomodulación de células  
dendríticas inducida por *F.*  
*hepatica***







## Introducción

El receptor tipo lectina de macrófago específico de Gal/GalNAc (MGL), también conocido como CLEC4A o CD301, es un receptor presente en células presentadoras de antígeno profesionales, que muestra especificidad por motivos glucídicos que presentan GalNAc terminal, incluyendo el antígeno Tn ( $\alpha$ GalNAc-O-Ser/Thr) y LacDiNAc ( $\text{GalNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ , LDN) [100, 102]. Mientras que sólo hay un gen en humanos (hMGL), existen dos ortólogos presentes en ratón, mMGL1 (CD301a) y mMGL2 (CD301b), que difieren en su especificidad [128, 187]. Interessantemente, a pesar de que mMGL1 presenta mayor similitud estructural con hMGL, mMGL2 y hMGL muestran una especificidad de ligando muy similar [198]. En contraste, mMGL1 reconoce los antígenos Lewis<sup>x</sup> ( $\text{Gal}\beta 1\text{-4}(\alpha\text{Fuc}1\text{-3})\text{GlcNAc}$ ) y Lewis<sup>a</sup> ( $\text{Gal}\beta 1\text{-3}(\alpha\text{Fuc}1\text{-4})\text{GlcNAc}$ ).

Se ha reportado previamente que tanto el MGL humano como sus ortólogos murinos son capaces de reconocer glicocojungados presentes en parásitos helmintos como *Schistosoma mansoni* [70], *Trichuris suis* [82] y *Taenia crassiceps* [199]. Recientemente, se ha propuesto que las células dendríticas dermales MGL<sup>+</sup> se encuentran especializadas en la inducción de respuestas inmunes de tipo Th2 tanto en modelos de alergia como en infección por helmintos [199].

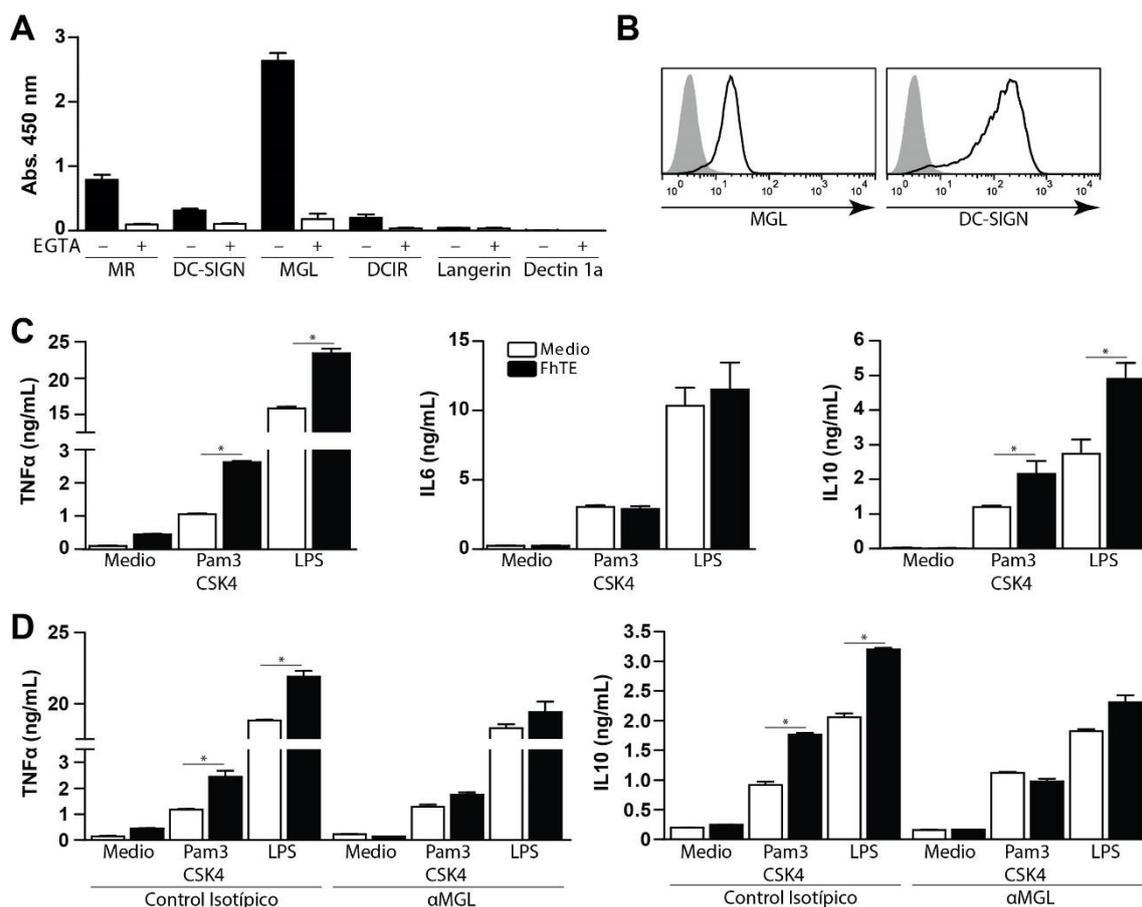
Dado que glicanos de *F. hepatica* modulan la maduración de células dendríticas, induciendo respuestas inmunes de tipo Th2/regulatorio [28, 39, 59, 138], y que este parásito expresa el antígeno Tn [137], se evaluó el potencial papel de MGL en el reconocimiento de glicanos parasitarios al igual que en mediar la inmunomodulación inducida por *F. hepatica*. Nuestros resultados sugieren que el antígeno Tn expresado en la superficie de *F. hepatica* es capaz de modular la maduración de moDCs, aumentando la producción de IL-10 y TNF $\alpha$ , en un proceso mediado por hMGL. Asimismo, se muestra que células MGL<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>lo</sup> son reclutadas al peritoneo de ratones infectados. Interessantemente, estas células expresan las citoquinas regulatorias IL-10, TNF $\alpha$  y TGF $\beta$  y una variedad de marcadores asociados a la regulación. Los resultados presentados aquí sugieren un papel de MGL en la inmunomodulación inducida por *F. hepatica*, y contribuyen a entender mejor los mecanismos moleculares inducidos por el parásito.

## **Resultados**

### *Los glicoconjugados de *F. hepatica* potencian la producción de TNF $\alpha$ e IL-10 por ligandos de TLR vía hMGL*

Hasta aquí nuestros resultados sugieren que DC-SIGN puede mediar las propiedades inmunomoduladoras de *F. hepatica*. Sin embargo, cuando la interacción de diferentes CLR con FhTE fue evaluada a través de un ensayo de tipo ELISA, se vió que hMGL es, dentro de los receptores estudiados, el que presenta mayor interacción con glicoconjugados de *F. hepatica* (Figura 6.1A). Asimismo, se observa interacción del MR, DC-SIGN y DCIR, aunque con un grado menor. No se encontró reconocimiento por Dectin-1 o Largerin. La unión de los diferentes CLR a FhTE fue abrogada en presencia del agente quelante EGTA, indicando que la presencia de cationes divalentes como el Ca<sup>2+</sup> es esencial para dicha interacción.

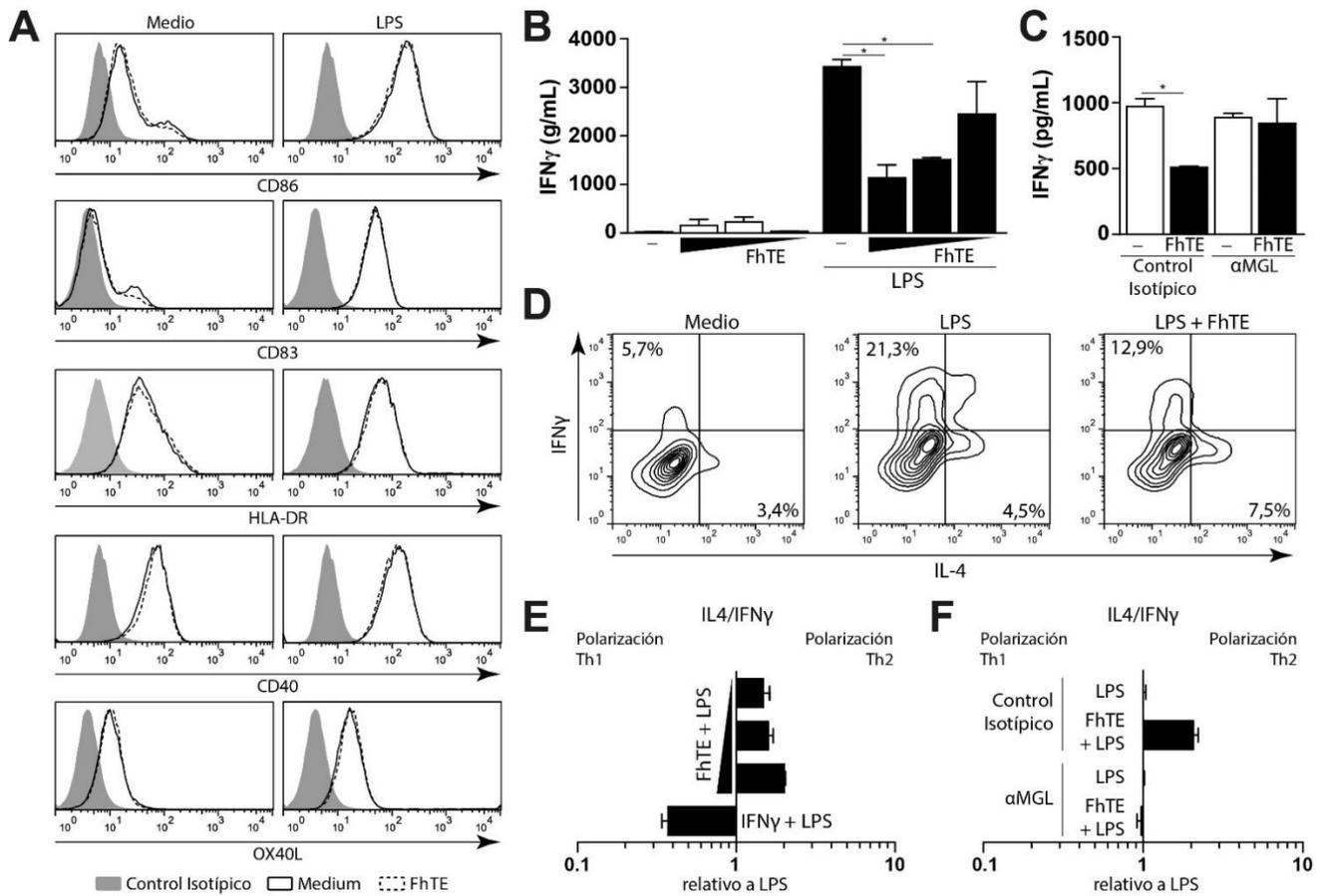
Dado que hMGL interactúa fuertemente con FhTE y que la señalización a través de MGL puede modular la maduración de moDCs inducida por ligandos de TLR [106], se pensó en evaluar si FhTE es capaz de modular la maduración de células dendríticas a través de dicho CLR. Sin embargo, como se observa en la Figura 5.3, un anticuerpo bloqueante de hMGL fue incapaz de impedir la modulación inducida por FhTE soluble. Recientemente, se ha reportado que la modulación inducida por hMGL se observa cuando se utilizan ligandos o anticuerpos inmovilizados sobre placa, pero no cuando se utiliza en forma soluble [106]. Es por ésto que se evaluó la capacidad de modular la maduración de células dendríticas de FhTE inmovilizado sobre placa. Para ello, en primer lugar, se confirmó la expresión de hMGL en moDCs (Figura 6.1B). Luego, se incubaron moDCs con FhTE sensibilizado sobre placas de ELISA en presencia o ausencia de Pam3CSK4 (ligando de TLR1/2) o LPS (ligando de TLR4), y la producción de citoquinas fue evaluada en el sobrenadante de cultivo. A pesar de que FhTE no indujo la expresión de ninguna de las citoquinas evaluadas, fue capaz de potenciar la producción de TNF $\alpha$  e IL-10, pero no IL-6, por moDCs estimuladas por ligandos de TLR (Figura 6.1C). Interesantemente, un anticuerpo bloqueante de hMGL fue capaz de abolir dicho incremento (Figura 6.1D), indicando la existencia de una regulación cruzada entre los receptores de TLR y hMGL en presencia de componentes parasitarios.



**Figure 6.1. MGL reconoce glicoconjugados de *F. hepatica* y potencia la producción de IL-10 y TNF $\alpha$  por moDCs maduras por ligandos de TLR.** A) La interacción de diferentes hCLR-Fc con FhTE fue evaluada en un ensayo tipo ELISA, en presencia (+) o ausencia (-) de EGTA. B) La Expresión de MGL y DC-SIGN (como marcador de diferenciación) en moDCs fue confirmada por citometría de flujo. C) Producción de IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$  por moDCs estimuladas con Pam3CSK4 o LPS en presencia o ausencia de FhTE inmobilizado en placa. D) moDCs fueron pre-incubadas con un anticuerpo bloqueante de MGL o un control isotópico, para luego ser estimuladas como en C). Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\* $p < 0.05$ ).

### *Los antígenos de *F. hepatica* inducen polarización Th2 mediante la reducción de IFN $\gamma$ a través de su interacción con hMGL*

Luego, se evaluó si la interacción de FhTE con hMGL en moDCs es capaz de modular la diferenciación de linfocitos T en una respuesta alogénica. Para ello, se analizó en primer lugar la capacidad de FhTE de modular la expresión de marcadores de co-estimulación por moDCs. El lisado parasitario fue incapaz de inducir la expresión de los diferentes marcadores de co-estimulación estudiados y de modular la expresión de los mismos inducida por LPS (Figura 6.2A).



**Figure 6.2. FhTE es capaz de inducir una polarización Th2 a través de la reducción de IFN $\gamma$ .** A) moDCs fueron incubadas con FhTE inmovilizado sobre placa en presencia o ausencia de LPS (10  $\mu$ g/mL) por 48 horas, para luego evaluar la expresión de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo. B-C) Para evaluar la capacidad de moDCs estimuladas como en A) de polarizar linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive, las mismas se lavaron y se incubaron con linfocitos T alogénicos CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> purificados de sangre periférica (relación 1:10) en presencia de la Enterotoxina Estafilocócica B (10 pg/mL). Luego de 5 días, se evaluó la producción de IFN $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo. D-F) Los linfocitos estimulados en B) y C) fueron expandidos por incubación con IL-2 durante 5-7 días, y la polarización Th1/Th2 de los linfocitos T se evaluó por tinción intracelular de IFN $\gamma$  e IL-4 luego de ser estimuladas con PMA e Ionomicina en presencia de Brefeldina A. Cuando se indica, las moDCs fueron preincubadas con un anticuerpo bloqueante de hMGL previo a su estimulación. La relación IL-4/IFN $\gamma$  fue calculada en base al control (sólo LPS), basado en células positivas para sólo una de las citoquinas. Las concentraciones de FhTE utilizadas: 200, 100 y 50  $\mu$ g/mL. Un resultado representativo de tres experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\* $p$  < 0.05).

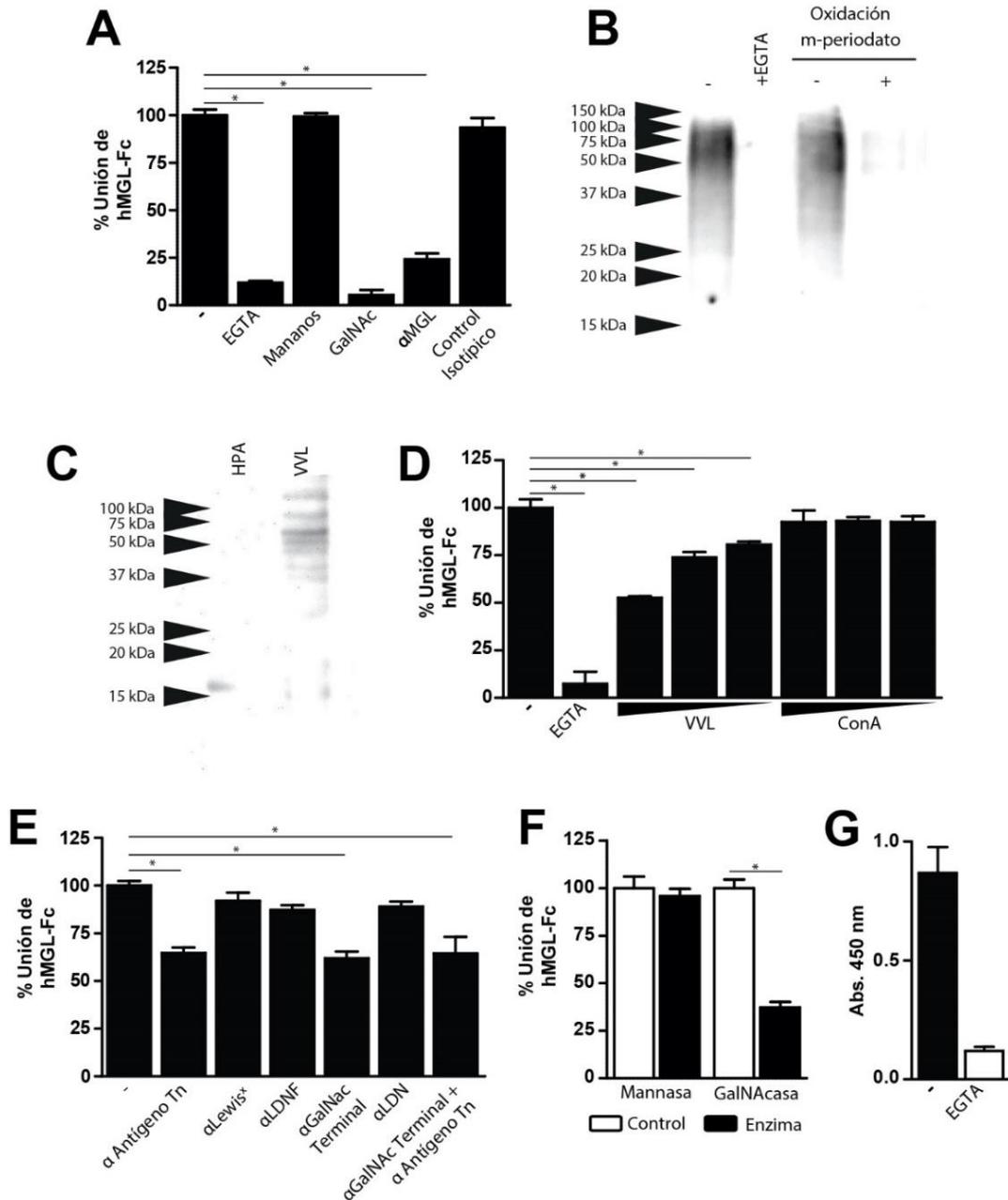
Sin embargo, la estimulación de moDCs con FhTE fue capaz de reducir la capacidad de dichas células de inducir una respuesta alogénica por linfocitos T naive, de forma dosis-dependiente (Figura 6.2B). La capacidad reducida de inducir linfocitos T productores de IFN $\gamma$  por moDC estimuladas con FhTE/LPS fue abolida por un anticuerpo anti-MGL, pero no por un control isotópico (Figura 6.2C). Finalmente, se estudió la capacidad de dichas células de polarizar respuestas de linfocitos T hacia Th1 o Th2. Para ello, linfocitos T naive co-cultivados con moDCs

estimuladas con FhTE en presencia o ausencia de LPS fueron reestimulados con PMA e Ionomicina en presencia de Brefeldina A, para medir la producción intracelular de IL-4 e IFN $\gamma$ . Como se observa en la Figura 6.2D, FhTE fue capaz de inducir la polarización de linfocitos T hacia un fenotipo Th2, dado que aumenta el ratio IL-4/IFN $\gamma$ , cuando se compara con moDCs estimuladas con LPS (Figura 6.2 D y E). Este aumento fue producido principalmente por una reducción en la producción de IFN $\gamma$ . Asimismo, este efecto de FhTE fue mediado por hMGL, dado que un anticuerpo específico para dicho CLR abole dicho proceso (Figura 6.2F).

#### *hMGL interactúa con el antígeno Tn presente en FhTE*

Para identificar la naturaleza de los glicoconjugados de *F. hepatica* reconocidos por hMGL, ensayos de inhibición y deglicosilación selectiva se llevaron a cabo para abolir el reconocimiento de FhTE por dicho CLR. La unión de hMGL fue abolida en presencia de EGTA, GalNAc y un anticuerpo bloqueante anti-hMGL, pero no fue modificada por incubación con mananos o un control isotópico (Figura 6.3A).

Las estructuras glucídicas reconocidas por hMGL fueron identificadas por western blot como un grupo de glicoproteínas en el rango entre 50 kDa y 100 kDa (Figura 6.3B). Interesantemente, el reconocimiento de hMGL-Fc fue inhibido tanto en presencia de EDTA como luego de la oxidación con m-periodato de FhTE, confirmando que la interacción es dependiente de las estructuras glucídicas presentes en el lisado parasitario. Para confirmar que los residuos de GalNAc se encuentran presentes en FhTE, se llevó a cabo lectin blots usando las lectinas específicas para GalNAc de *Helix pomatia* (HPA) y *Vicia villosa* (VVL). La VVL, pero no HPA, fue capaz de reconocer FhTE, en consistencia con nuestros resultados previos descritos en la Figura 3.3. Cabe destacar que VVL reconoció componentes de FhTE con un peso molecular aparente similar al que se observada para hMGL. Asimismo, el reconocimiento por hMGL fue inhibido cuando se realiza preincubación de FhTE con la lectina VVL, pero no ConA, dos lectinas que reconocen fuertemente FhTE [193], sugiriendo que VVL y hMGL interactúan con los mismos ligandos presentes en el lisado (Figura 6.3D).



**Figure 6.3. Caracterización de los glicoconjugados que son reconocidos por hMGL.** A) Se realizaron ensayos de inhibición de la unión de hMGL-Fc a FhTE pre-incubando dicho receptor con EGTA, mananos, GalNAC, un anticuerpo bloqueante específico o un control isotópico. B) Se realizó un western blot de FhTE utilizando hMGL en presencia o ausencia de EGTA. Cuando se indique, se realizó la oxidación con meta-periodato de las membranas de nitrocelulosa transferidas. C) Lectin Blot de FhTE utilizando las lectinas específicas para GalNAC VVL y HPA. D-E) Inhibición de la unión de hMGL-Fc a FhTE previamente incubado con D) las lectinas VVL y ConA (10, 1 y 0,1 μg/mL) o E) anticuerpos específicos de diferentes estructuras glucídicas. F) La unión de hMGL fue también evaluada en FhTE tratado previamente con las enzimas manosidasa (Man) o GalNacasa (GalNAC). G) La capacidad de hMGL de reconocer un extracto tegumentario del parásito se evaluó mediante ELISA en presencia o ausencia de EGTA. Un resultado representativo de cuatro experimentos independientes es mostrado (±SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\*p < 0.05).

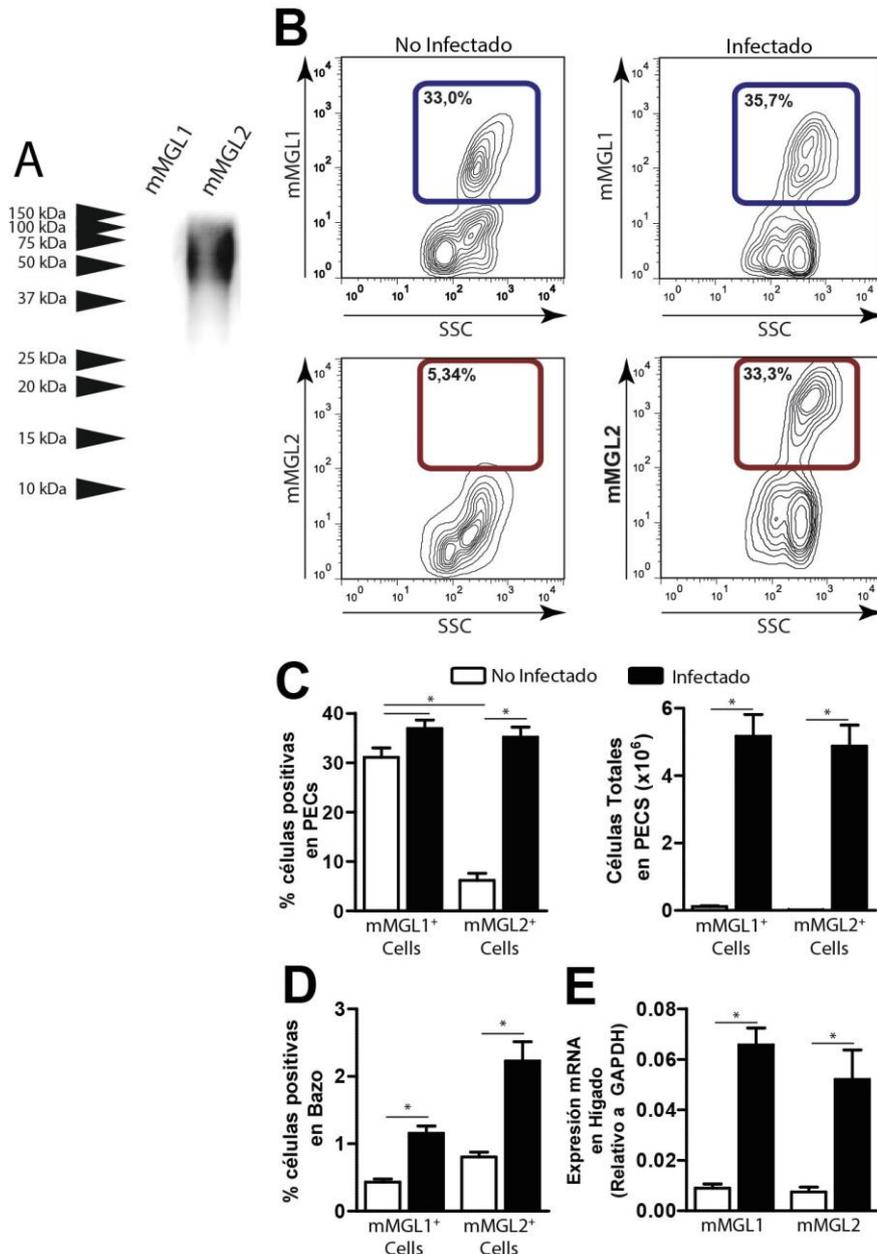
Como forma de establecer la naturaleza de las estructuras glucídicas que contienen GalNAc que son reconocidas por hMGL, se utilizaron anticuerpos específicos del antígeno Tn ( $\alpha$ GalNAc-Thr/Ser), LDNF (GalNAc $\beta$ 1-4(Fuca $\alpha$ 1-3)GlcNAc-R) y LDN (GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc-R). Como se observa en la Figura 6.3E, únicamente el anticuerpo específico para el antígeno Tn fue capaz de reducir el reconocimiento de FhTE por hMGL. Asimismo, el reconocimiento fue inhibido cuando el extracto fue tratado con la enzima GalNAcasa, pero no Manosidasa, indicando que hMGL es capaz de reconocer residuos de GalNAc terminales presentes en FhTE (Figura 6.3F). En conjunto, estos resultados sugieren que hMGL reconoce el antígeno Tn presente en *F. hepatica*.

El hecho de que la señalización a través de MGL se observe únicamente cuando FhTE se encuentra inmovilizado, sugiere que MGL podría reconocer ligandos anclados en la superficie del parásito. Por ello, se investigó qué ligandos de hMGL se encuentran presente en un extracto tegumentario de *F. hepatica*. De hecho, hMGL reconoce FhTeg de forma dependiente de  $Ca^{2+}$  (Figura 6.3G).

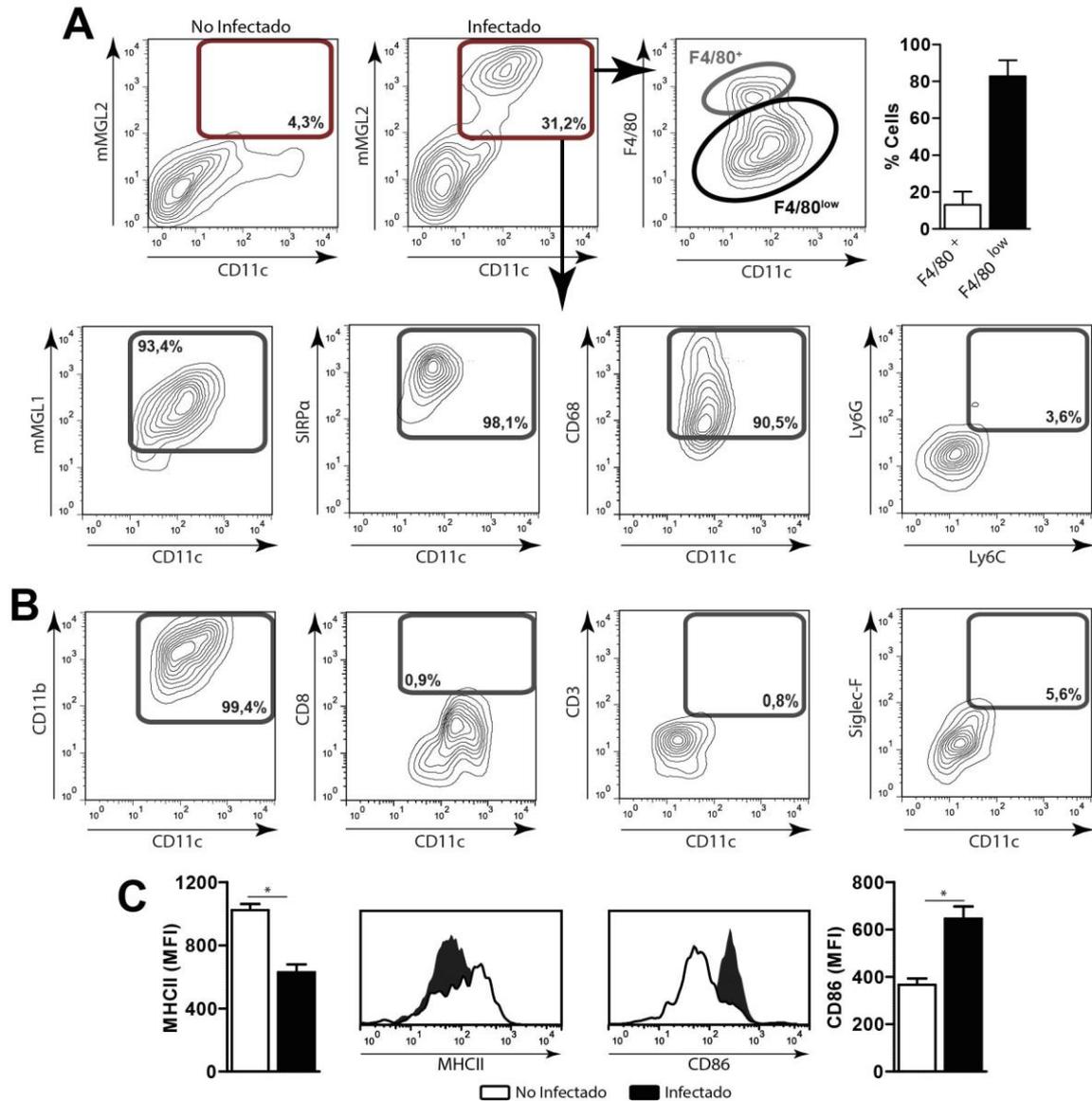
#### *Células mMGL2<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> son reclutadas al peritoneo de ratones infectados con F. hepatica*

Hasta aquí nuestros resultados *in vitro* sugieren que MGL es capaz de interactuar con el antígeno Tn presente en la superficie de *F. hepatica*, para modular la maduración de células dendríticas e inducir un perfil Th2. Con el fin de estudiar la relevancia de estos hallazgos *in vivo*, se estudió el rol de MGL en un modelo murino de infección. Para ello, se infectaron ratones por vía oral con 15 metacercarias de *F. hepatica* y se analizó la expresión de mMGL1 y mMGL2 en células de bazo, peritoneo e hígado luego de 3 semanas post infección.

Dado que existen dos isoformas murinas de MGL (mMGL1 y mMGL2), primero se evaluó si éstas son capaces de reconocer glicoconjugados presentes en FhTE por Western Blot. Como se puede observar en la Figura 6.4A, únicamente mMGL2 fue capaz de reconocer componentes parasitarios, en un rango de peso molecular similar al observado para hMGL, lo cual concuerda con lo reportado previamente, en que hMGL y mMGL2 presentan similar especificidad de ligando.



**Figure 6.4. Células mMGL<sup>+</sup> son reclutadas al peritoneo durante la infección por *F. hepatica*.** A) El reconocimiento de FhTE por mMGL1 y mMGL2 fue analizado por western blot utilizando mCLR-Fc. B-D) Evaluación por citometría de flujo de células mMGL1<sup>+</sup> y mMGL2<sup>+</sup> en la cavidad peritoneal y bazo de ratones infectados y ratones control. E) Expresión de mRNA de mMGL1 y mMGL2 en hígado de animales infectados y no infectados. Un resultado representativo de cuatro experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\* $p < 0.05$ ).



**Figure 6.5. Immunofenotipo de las células mMGL2<sup>+</sup> presentes en el peritoneo de animales infectados con *F. hepatica*.** La expresión de diferentes marcadores de superficie en las células mMGL2<sup>+</sup> presentes en el peritoneo de animales infectados fue analizada por citometría de flujo. A) Análisis de las células del peritoneo, seleccionando las células mMGL2<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. Se muestra también la cuantificación de las dos poblaciones obtenidas para la tinción con F4/80. B) Dado que todas las células de animales infectados presentan mMGL2<sup>+</sup>, los marcadores CD11b, CD8, CD3 y Siglec-F fueron analizados en células CD11c<sup>+</sup>. C) Análisis de la expresión de MHCII y CD86 en células CD11c<sup>+</sup> de PECs de ratones infectados y no infectados. Un resultado representativo de cuatro experimentos independientes es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\* $p < 0.05$ ).

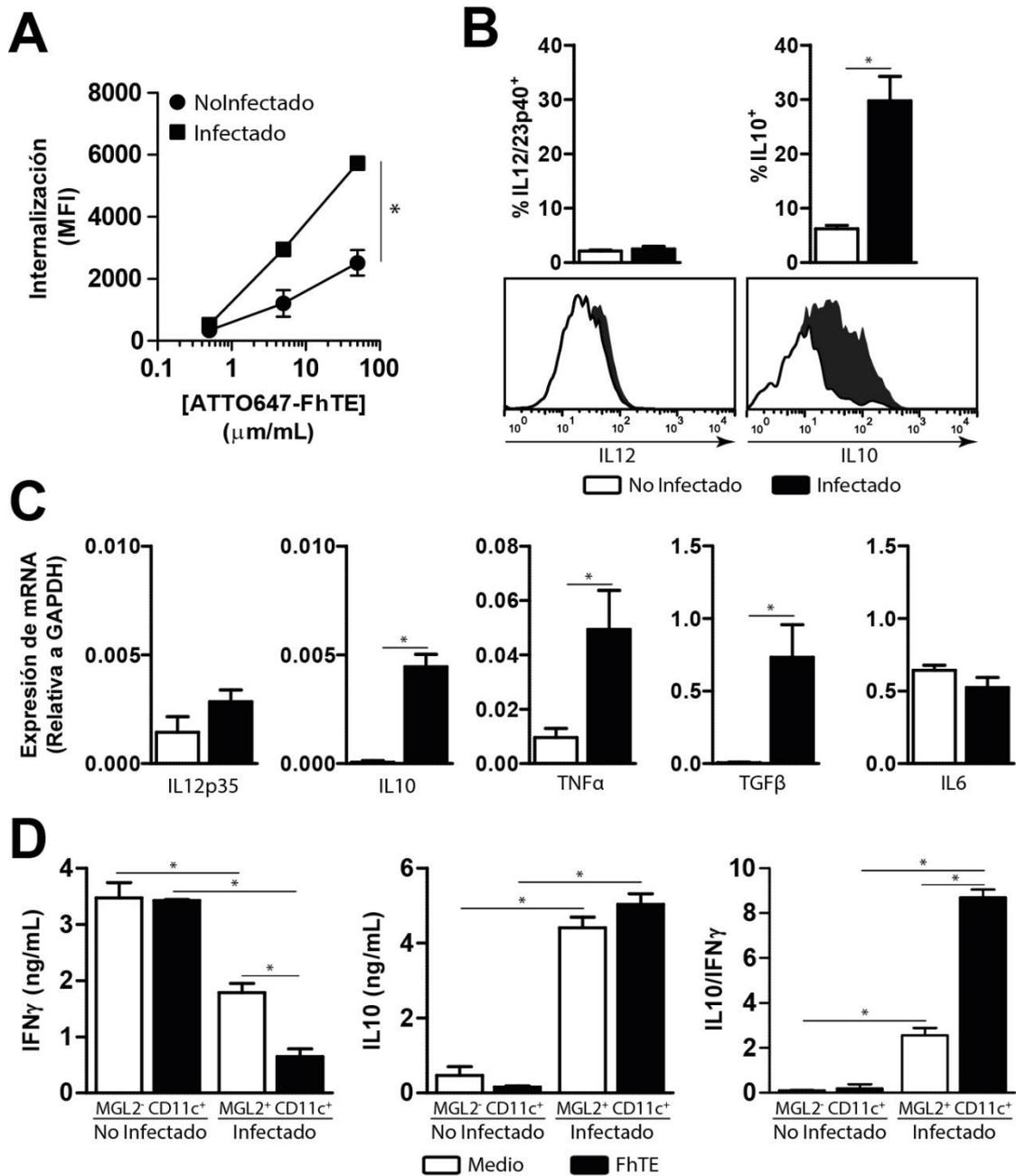
Interesantemente, se detectó un aumento significativo en la proporción de células mMGL2<sup>+</sup> en la cavidad peritoneal, mientras que no se observó un cambio en las células mMGL1<sup>+</sup> (Figura 6.4B y C). En contraste, cuando se analizó la cantidad total de células, se evidenció un aumento tanto de mMGL1<sup>+</sup> y mMGL2<sup>+</sup> PECs en animales infectados (Figura 6.4C), probablemente debido al gran

reclutamiento de células producto de la infección. Por otro lado, ambas isoformas murinas se encuentran aumentadas en bazo (evaluado por FACS, Figura 6.4D) y en hígado (evaluado por qRT-PCR, Figura 6.4E).

Con el fin de caracterizar la población celular mMGL2<sup>+</sup> presente en el peritoneo de animales infectados, se realizó un análisis de fenotipo mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 6.5A, células CD11c<sup>+</sup> de ratones infectados, pero no de ratones control, presentaron mMGL2. Estas células también expresaron mMGL1, CD11b, SIRPα y CD68, mientras que fueron negativas para Ly6G, Ly6C, Siglec-F, CD3 y CD8 (Figura 6.5A y B). Asimismo, se pudieron distinguir dos poblaciones de células mMGL2<sup>+</sup> en cuanto a la expresión de F4/80, siendo la población de baja expresión la mayoritaria. Cuando se analizó la expresión de los marcadores MHCII y CD86, se encontró que las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> de animales infectados presentaron una menor expresión de MHCII, pero una mayor expresión de CD86, cuando se comparan con las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>-</sup> de animales control (Figura 6.5C).

#### *Las células mMGL2<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> de ratones infectados con *F. hepatica* expresan IL-10, TNFα y TGFβ y modulan la producción de citoquinas por linfocitos T CD4<sup>+</sup> alogénicos*

Con el fin de establecer si las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> presentan propiedades inmunomoduladoras, se realizó un análisis funcional evaluando su capacidad de internalizar componentes parasitarios y de secretar citoquinas. Para ello, los PECs de animales infectados y no infectados se incubaron con ATTO647-FhTE y su internalización fue evaluada por citometría de flujo en células CD11c<sup>+</sup> (Figura 6.6A). Las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> de animales infectados presentaron una mayor capacidad de internalizar componentes parasitarios que células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>-</sup> de animales control. Además, se produjeron mayores niveles de las citoquinas regulatorias IL-10, TNFα y TGFβ, mientras que no se observaron diferencias en la expresión de IL-6, IL-12/23p40 o IL-12p35 (Figura 6.6B y C), sugiriendo un potencial rol regulador de estas células durante la infección.



**Figura 6.6. Análisis funcional de células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup>.** A) La internalización por las células CD11c<sup>+</sup> fue evaluada por citometría de flujo en PECs previamente incubados con diferentes concentraciones de ATTO647-FhTE por 1 hora a 37°C o 4°C como control. La internalización fue calculada como la diferencia entre el MFI obtenido a 37°C y a 4°C. B) La producción de IL-12/23p40 e IL-10 por células CD11c<sup>+</sup> en PECs fue evaluada por citometría de flujo, luego de incubar los PECs con Brefeldina A durante 6 horas. C) Las células CD11c<sup>+</sup> fueron purificadas de la cavidad peritoneal de ratones infectados 3 semanas post infección y ratones control. La expresión de IL-12p35, IL-6, IL-10, TNFα y TGFβ fue evaluada por qRT-PCR. D) Células CD11c<sup>+</sup> purificadas fueron estimuladas con FhTE inmovilizado en placa durante 16 horas a 37°C, lavadas e incubadas con linfocitos T CD4<sup>+</sup> de animales de ratones C57BL/6. Un resultado representativo de tres infecciones independientes (n=3-5) es mostrado (±SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones indicadas (\*p < 0.05).

Finalmente, se evaluó la capacidad estimuladora de las células CD11c<sup>+</sup> en una reacción mixta de leucocitos usando linfocitos T CD4<sup>+</sup> alogénicos, provenientes de bazos de ratones C57BL/6. Las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> de animales infectados indujeron la producción de IL-10, mientras que se observó una disminución de IFN $\gamma$  por linfocitos T CD4<sup>+</sup> alogénicos, cuando se compara con células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>-</sup> purificadas de ratones no infectados, conduciendo a un aumento de la relación IL-10/IFN $\gamma$ . Interesantemente, las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> (pero no CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>-</sup>) incrementó la relación IL-10/IFN $\gamma$  cuando son estimuladas con FhTE inmovilizado sobre placa, debido a un descenso de la producción de IFN $\gamma$  (Figura 6.6D), en línea a lo visto en humano (Figura 6.2D-F). Estos resultados sugieren que FhTE podría ser reconocido por mMGL2 para modular las células CD11c<sup>+</sup>.

Para entender con mayor profundidad la función inmunoreguladora de las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> de animales infectados, se evaluó la expresión de una variedad de moléculas que podrían participar en diferentes funciones de las células dendríticas, y se compararon con las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>-</sup> de animales control. Como se muestra en la Figura 6.7, las células CD11c<sup>+</sup> de ratones infectados expresaron mayores niveles de mMGL2 y del MR que CD11c<sup>+</sup> de ratones control (Figura 6.7A). Además, dichas células también expresaron niveles aumentados de Fizz-1 y Arg-1 (Figura 6.7B), comúnmente asociados a la activación alternativa de macrófagos. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la expresión de la Óxido nítrico sintasa inducible, asociada a una activación pro-inflamatoria de macrófagos. Asimismo, las células purificadas de animales infectados presentaron niveles aumentados de CCL5, al igual que la molécula inmunomoduladora PD-L1 y el factor de transcripción IRF4 (Factor regulador de interferón 4, por su sigla en inglés interferon regulatory factor 4), conocido por controlar la diferenciación de linfocitos T a un fenotipo Th2.

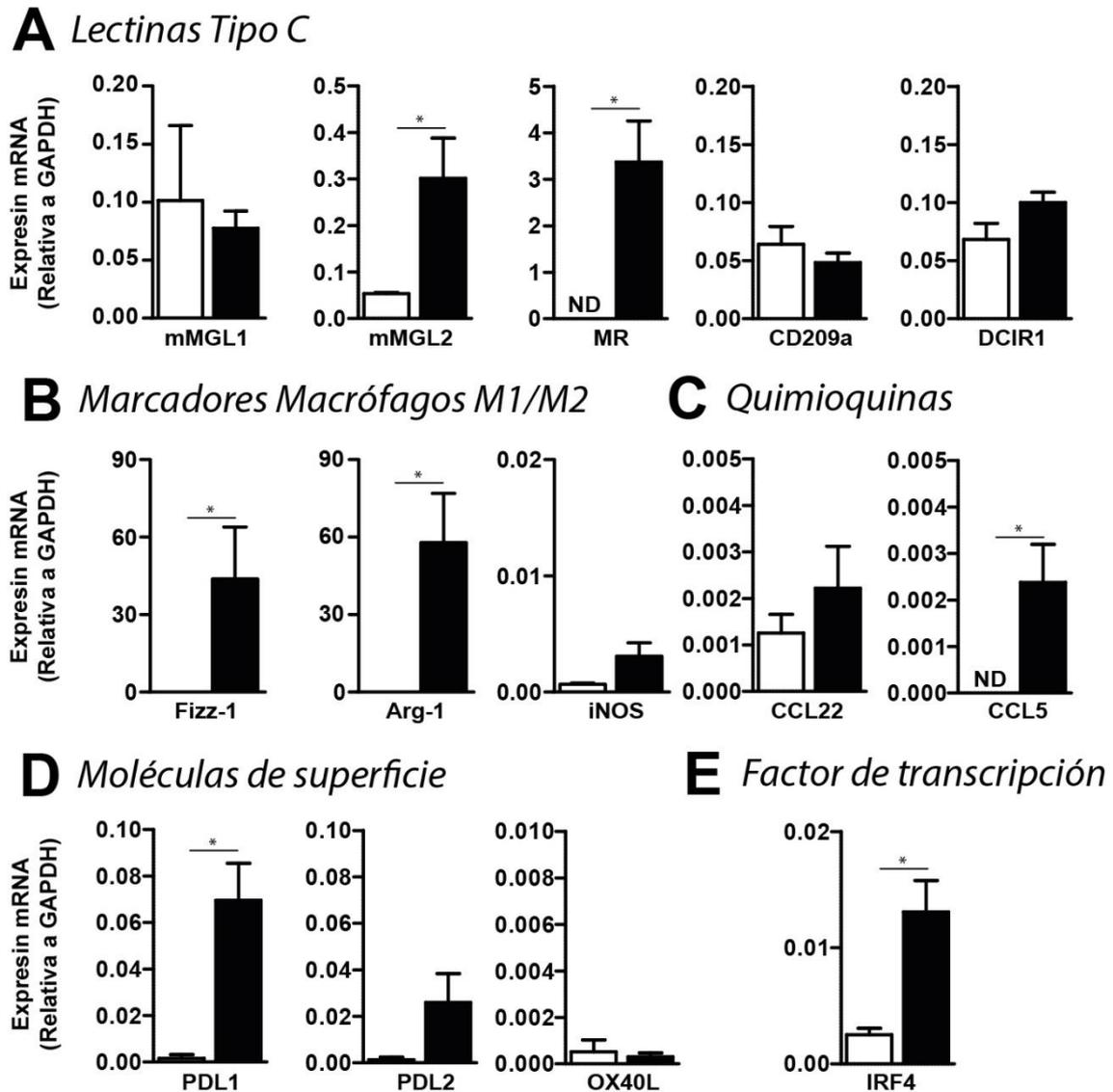


Figure 6.7. Expresión de lectinas tipo C, quimioquinas y moléculas reguladoras en células CD11c<sup>+</sup> de animales infectados y no infectados. La expresión de CLRs (A), marcadores de macrófagos (B), quimioquinas (C), moléculas reguladoras de superficie (D) e IRF4 (E) fueron evaluados por qRT-PCR en células CD11c<sup>+</sup> de animales infectados (barras negras) y control (barras blancas). Un resultado representativo de tres infecciones independientes (n=3-5) es mostrado ( $\pm$ SEM, indicado por las barras de error). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a células CD11<sup>+</sup> purificadas de animales no infectados (\*p < 0.05).

Nuestros resultados sugieren que las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> son reclutadas a la cavidad peritoneal durante la infección por *F. hepatica*, adquiriendo diferentes marcadores asociados a macrófagos reguladores, regulando potencialmente la polarización de linfocitos T a un fenotipo Th2/regulador.

## **Discusión**

Los resultados mostrados en el presente capítulo sugieren que MGL es capaz de reconocer el antígeno Tn presente en la superficie de *F. hepatica*, induciendo una señalización capaz de modular la maduración de células dendríticas inducida por ligandos TLR y su capacidad estimuladora de linfocitos T, tanto *in vitro* como *in vivo*.

La capacidad de MGL de actuar como un receptor de reconocimiento de diferentes patógenos ha sido descrita previamente. De hecho, MGL es capaz de reconocer estructuras glucídicas expresadas en bacterias como *Neisseria gonorrhoeae* [200], *Bordetella pertussis* [201] y *Campylobacter jejuni* [99, 108], al igual que virus, incluido el Ebola [202] e Influenza [203]. Además, las moléculas derivadas de helmintos pueden también interactuar con MGL, como es el caso de *Schistosoma mansoni*, el cual es reconocido a través de residuos de LacdiNAc [70, 204], o *Trichuris suis*, con el que interacciona a través de residuos de  $\alpha$ GalNAc terminales [82].

En este capítulo, se muestra que moléculas de *F. hepatica* son capaces de interactuar con MGL y que, en conjunto con la señalización por ligandos de TLR, resulta en una mayor producción de IL-10 y TNF $\alpha$ . La producción de IL-10 y TNF $\alpha$  por células dendríticas humanas MGL<sup>+</sup> ha sido descrita previamente [106, 107]. Es bien sabido que IL-10 es una citoquina con potentes propiedades anti-inflamatorias que juega un rol central en limitar las respuestas inmunes contra patógenos. Por otro lado, TNF $\alpha$ , a pesar de ser generalmente catalogada como citoquina pro-inflamatoria, tiene algunas propiedades inhibitorias, en particular cuando se encuentra asociada a IL-10. De hecho, las células dendríticas tolerogénicas generadas en presencia de vitamina D3, secretan una mayor cantidad de IL-10 y TNF $\alpha$  luego de la activación por LPS, e inducen la expansión de linfocitos T reguladores de forma dependiente de TNF $\alpha$  [205]. Las células dendríticas MGL<sup>+</sup> son también capaces de instruir la polarización de linfocitos T hacia células reguladoras Tr1, en un mecanismo dependiente de IL-10 [107]. Este fenómeno puede constituir un mecanismo utilizado por *F. hepatica* para evadir las respuestas inmunes protectoras del hospedero, como ha sido propuesto para *C. jejuni*, donde MGL inhibe la expresión de marcadores asociados a la maduración de células dendríticas y limita la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 [108].

De todas formas, la observación respecto al rol inmunomodulador de MGL por componentes de *F. hepatica* resulta de experimentos *in vitro*. Para poder evaluar el rol inmunomodulador de MGL *in vivo* durante la infección por *F. hepatica*, se estudió la expresión de MGL en animales

infectados. A pesar de que se observa un aumento en la cantidad de células positivas tanto para mMGL1 como para mMGL2, la proporción de células mMGL2<sup>+</sup> estuvo claramente aumentada en PECs y bazo, sugiriendo o bien un reclutamiento de estas células o un gran aumento en la expresión de mMGL2 durante la infección. Es de notar que el estímulo tolerogénico dexametasona induce la expresión de MGL en células dendríticas [103], sugiriendo un rol en el desarrollo en la tolerancia. En este escenario, se podría especular que mMGL2, pero no mMGL1, parecerían tener un rol durante el proceso de infección, debido a que únicamente mMGL2 es capaz de reconocer componentes parasitarios.

Las células mMGL2<sup>+</sup> expresaron también los marcadores mMGL1, CD11c, CD11b, CD68 y SIRP $\alpha$ . Asimismo, éstas expresan bajos niveles de F4/80, marcador usado típicamente para la identificación de macrófagos [206], pero también expresado en células dendríticas inflamatorias y en la subpoblación de células dendríticas CD11b<sup>+</sup> [207]. Las células dendríticas inflamatorias son capaces de inducir linfocitos Th2 en respuesta a la inflamación inducida por adyuvantes que contienen aluminio o en asma inducido por alérgenos [208-210]. Interesantemente, un fenotipo similar para células mMGL1<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> doble positivas fue encontrado en pulmón, bazo y médula ósea de ratones naive, en un reporte donde sugieren que dichas células corresponden a células dendríticas convencionales, mientras que las células positivas únicamente para mMGL1 representan un grupo de células, incluyendo macrófagos y tanto células dendríticas convencionales como plasmocitoides [198]. Sin embargo, en nuestro caso, la presencia de CD68, hace pensar que dichas células representan macrófagos que, dado a la presencia de Fizz-1, Arg-1 y MR, estarían alternativamente activados. Las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> de la cavidad peritoneal también estuvieron caracterizadas por bajos niveles de MHCII, pero también una expresión aumentada de CD86, sugiriendo un fenotipo semi-maduro, que ya se describió para las células CD11c<sup>hi</sup> en el capítulo 3.

Nuestros resultados también indican que las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> presentan una mayor capacidad de internalizar moléculas parasitarias, cuando se comparó con las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>-</sup> de animales control, lo cual podría explicarse por la presencia del propio MGL al igual que del MR, un receptor que presenta una gran capacidad endocítica [179]. Este aumento en la internalización puede favorecer la presentación y activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> [211].

Durante la infección, las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> parecen adquirir un programa regulatorio que activa la producción específica de IL-10 por linfocitos T CD4<sup>+</sup> que concuerda con lo visto en el primer capítulo de la presente tesis, al igual que con lo descrito anteriormente [28, 138, 193].

De hecho, las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> producen las citoquinas inmunoregulatoras TGFβ, IL-10 y TNFα que han sido asociadas a la capacidad de activar linfocitos T CD4<sup>+</sup> alogénicos productores de IL-10, mientras que ello no pasa con las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>-</sup>. Estos resultados están en concordancia con datos previos que muestran que las células dermales CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> expresan bajos niveles de moléculas involucradas con respuestas inmunes Th1, cuando se las compara con las células dendríticas dermales [110]. Finalmente, las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> estimuladas con FhTE inmovilizado en placa, indujeron una mayor relación IL-10/IFNγ por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, debido a un descenso en la producción de IFNγ. Estos datos sugieren que componentes parasitarios inducen un programa inmunoregulator en las células dendríticas que regula su maduración y capacidad estimuladora de linfocitos alogénicos. Diferentes reportes están en línea con nuestros resultados, ya que se ha descrito que las células dendríticas MGL2<sup>+</sup> son esenciales para un eficiente desarrollo de respuestas tipo Th2 por el parásito *Nippostrongylus brasiliensis* [109]. Asimismo, células dendríticas humanas MGL<sup>+</sup> expuestas a LPS de *N. gonorrhoeae* (que lleva consigo residuos de GalNAc Terminal) son propensas a inducir linfocitos T de tipo Th2 [200].

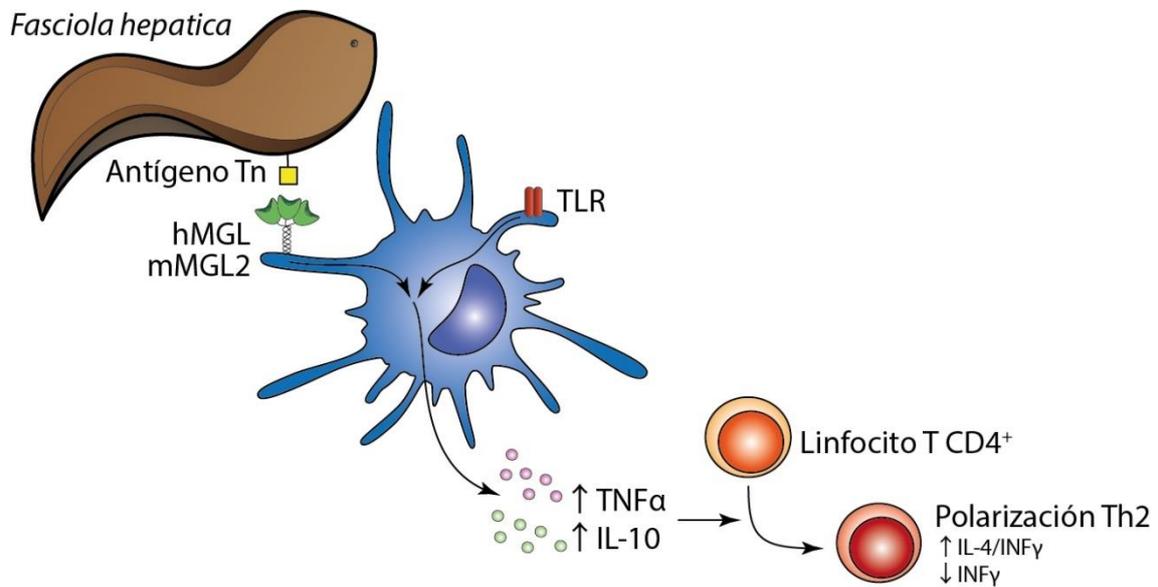
Es importante notar que las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> presentan una mayor expresión del MR, por lo que podría pensarse que el mismo participa en la señalización inducida por FhTE en dichas células. Sin embargo, se ha reportado previamente que la señalización por el MR se pierde cuando se utilizan ligandos inmovilizados, sugiriendo la necesidad de internalización para inducir la señalización correspondiente [83]. Dado que aquí la estimulación se realizó con FhTE inmovilizado, se perdería la señalización por el MR.

IRF4 es un factor de transcripción expresado en células dendríticas, necesario para la diferenciación Th2, pero no para respuestas Th1 [212]. Interesantemente, IRF4 también regula el desarrollo de células dendríticas mMGL2<sup>+</sup>, induciendo diversas subpoblaciones de células dendríticas: dermales mMGL2<sup>+</sup>, esplénicas CD8α<sup>-</sup> CD11b<sup>hi</sup>, al igual que polarización a macrófagos M2 [213-215]. Además, ha sido reportado que IRF4 es capaz de unirse al promotor del gen de IL-10 e inducir su expresión en células Th2 y Treg [216-219]. Considerando que las células peritoneales CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> de animales infectados expresan IRF4 e IL-10, y que además inducen la producción de IL-10 por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se podría hipotetizar que IRF4 participa en la producción de dicha citoquina. De todas formas, experimentos adicionales son necesarios para comprobar esta hipótesis, como podría ser el silenciamiento génico de IRF4 (por ejemplo, utilizando siRNA) o la realización de infecciones en ratones deficientes del mismo.

Las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> de animales infectados se caracterizaron por su alta expresión de Fizz y Arg-1, ausente en las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>-</sup> de animales control. Fizz es inducido durante respuestas de tipo Th2 desarrolladas en una infección por parásitos helmintos [220], y, a pesar de que se asocia a macrófagos alternativamente activados, también puede ser expresado por células dendríticas de ratones infectados por *Brugia malayi* [221]. Por otro lado, se ha mostrado que Arg-1 es capaz de impedir respuestas de linfocitos T mediante la reducción de la biodisponibilidad de L-arginina [222]. Además, las células dendríticas con propiedades supresoras pueden aumentar la expresión de Arg-1 [223]. En nuestro caso, las células murinas CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> aumentan también la expresión de las moléculas reguladoras PD-L1 y CCL5 (también conocida como RANTES). PD-L1 es, en conjunto con PD-L2, ligando de PD-1, un receptor inhibitor del sistema inmune, expresado en linfocitos T, y que limita la proliferación y favorece la homeostasis inmunológica [224]. La deficiencia de PD-L1 potencia las respuestas inmunes [225]. En el contexto de la infección por *F. hepatica*, las células dendríticas que aumentan la expresión de PD-L1 pueden jugar un rol en el control de la inducción de inmunidad específica contra el parásito, favoreciendo su sobrevivencia. Finalmente, CCL5 es una quimioquina que atrae linfocitos T, eosinófilos y basófilos al sitio de infección [226]. Interesantemente, las infecciones por parásitos helmintos están asociadas a altos niveles de CCL5, entre otras quimioquinas pro-inflamatorias [227, 228], particularmente por células dendríticas [229].

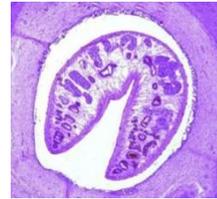
Es interesante notar aquí que, dado que las células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup> de animales infectados expresan el MR, el mismo podría tener un rol en la inmunomodulación de dichas células, más aún teniendo en cuenta que dicho receptor es capaz de interactuar con componentes derivados de *F. hepatica* y mediar una inhibición parcial de la maduración de BMDCs inducida por ligandos de TLR [188, 230]. Esto sugiere que el parásito podría estar señalizando a través de diferentes CLRs para evadir respuestas inmunes. De hecho, los CLRs Dectin-1 y el MR, han sido asociados a la modulación de la expresión de Arg-1 y PDL-2, al igual que la producción de TGFβ, por macrófagos en respuestas a productos de excreción-secreción de *F. hepatica* [77, 189]. De esta forma, se puede hipotetizar de que, dado que la señalización por MGL que se observó se da únicamente con ligandos de forma inmovilizada, dicho receptor es capaz de interactuar con glicoconjugados presentes en la superficie del parásito, mientras que moléculas solubles (como representan los productos de excreción-secreción) podrían señalizar a través del MR, Dectin-1 y/o DC-SIGN, conduciendo al desencadenamiento de diferentes mecanismos de inmunomodulación.

En conclusión, nuestros datos sugieren que el antígeno Tn presente en *F. hepatica* es capaz de señalar a través de MGL, desencadenando propiedades anti-inflamatorias en células dendríticas y llevando a una regulación tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa (Figura 6.8).

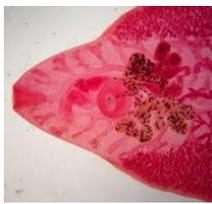


**Figura 6.8. Ilustración esquemática resumiendo los principales hallazgos del presente capítulo.** El antígeno Tn presente en la superficie de *F. hepatica* interactúa con MGL expresado en la superficie de células presentadoras de antígeno, desencadenando un programa regulador junto a la señalización de TLR, que induce un aumento en la expresión de TNF $\alpha$  e IL-10 e induce la polarización de linfocitos T hacia un fenotipo Th2/regulatorio.

# Capítulo VII: Discusión General y Conclusiones







Los parásitos helmintos representan uno de los mayores problemas sanitarios en países en vías de desarrollo. De hecho, la OMS ha estimado que aproximadamente 2 mil millones de personas se encuentran infectadas por uno o más de éste tipo de parásitos [231]. Esta gran capacidad infectiva de los helmintos, es fiel reflejo de su capacidad de modular el sistema inmune del hospedero, permitiendo una mayor sobrevivencia del parásito. *Fasciola hepatica*, un helminto de distribución mundial, afecta principalmente al ganado, aunque también afecta a más de dos millones de personas, mientras que cerca de 180 millones están en riesgo de infección [2, 5]. Actualmente, el empleo de drogas fasciolicidas representan la principal estrategia utilizada en el control de dicha enfermedad [10]. Sin embargo, no evitan el daño hepático producido y los animales no desarrollan inmunidad protectora por lo que se re-infectan fácilmente. En este contexto, el desarrollo de estrategias de inmunoprofilaxis contra la fasciolosis resulta de gran interés. De todas formas, las complejas estrategias de modulación del sistema inmune del hospedero dificultan su desarrollo y, de hecho, hasta la fecha no existen a nivel comercial vacunas disponibles contra *F. hepatica* [2, 14]. Por ello, es necesario profundizar nuestro conocimiento de los mecanismos inmunomoduladores desarrollados durante la infección, lo cual resulta importante no sólo desde un punto de vista de la investigación básica, sino además para el diseño racional de estrategias de inmunointervención.

Durante esta tesis, diferentes estrategias fueron utilizadas para el estudio del rol de las estructuras glucídicas de *Fasciola hepatica* en la inmunomodulación inducida durante la infección. Si bien en los últimos años diferentes reportes han sugerido un rol de estructuras glucídicas en la inmunomodulación por parásitos helmintos, era escasa la información disponible respecto a su rol en el contexto de infección por *F. hepatica* hasta el comienzo de esta tesis.

En primer lugar, se utilizó la oxidación con meta-periodato de sodio, ampliamente utilizada como una primera aproximación al rol biológico de los glicanos [68, 82, 232, 233]. Esta reacción, conduce a una pérdida de la estructura tridimensional de los glúcidos, por lo que toda actividad biológica que dependa de la misma, se ve abolida. Esta estrategia permitió evidenciar el rol de los glicanos en la inducción de IL-4 e IL-10 durante la infección, al igual que en la modulación de la maduración de células dendríticas murinas. Es más, este efecto sobre las células dendríticas se ve inhibido al pre-incubar estas con manosa, sugiriendo que el efecto inmunomodulador es mediado por receptor/es específico/s para este azúcar.

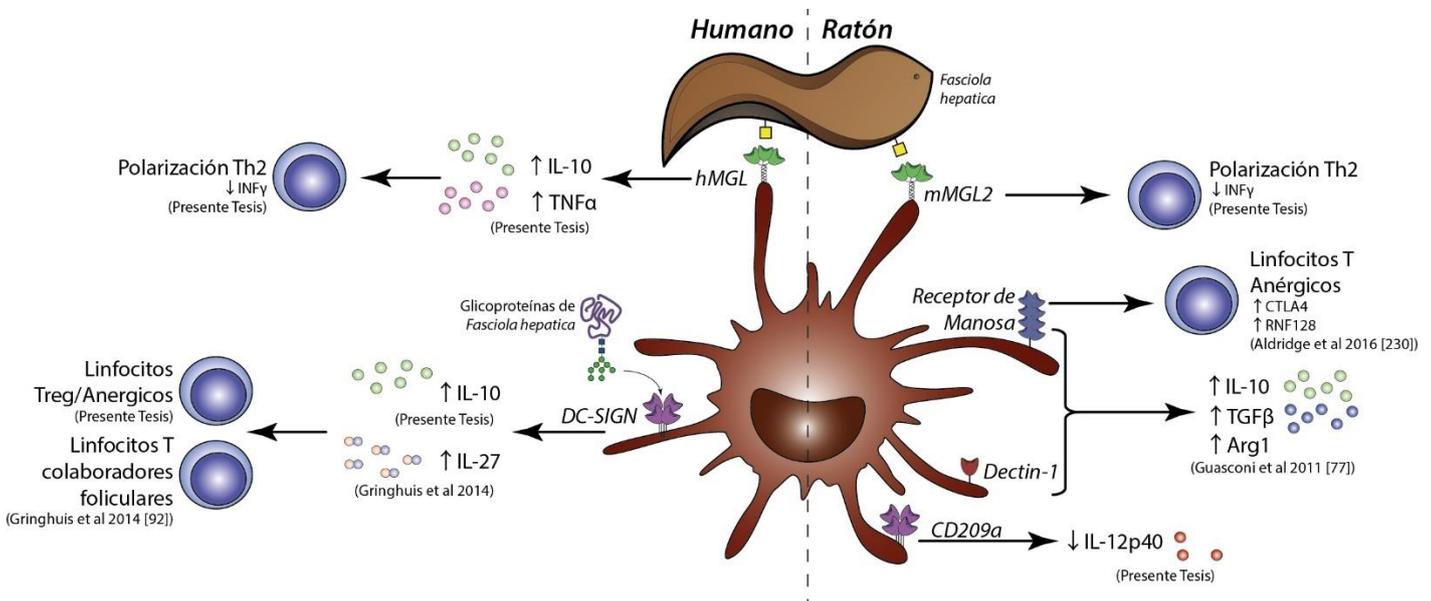
Por otro lado, se sintetizaron derivados inmovilizados de dos glicosidasas de interés biológico:  $\alpha$ -manosidasa y  $\beta$ -galactosidasa. Si bien el proceso de deglicosilación puede ser mejorado, nuestros resultados muestran que dichos derivados enzimáticos son capaces de inducir cambios en la glicosilación de proteínas, y repercutir de esta forma en procesos que son importantes desde punto de vista biológico. De hecho, su utilización en la deglicosilación específica del lisado parasitario nos permitió determinar que las estructuras glucídicas que contienen residuos de manosa son importantes para la inducción de IL-4 e IL-10 por linfocitos T CD4<sup>+</sup> de animales infectados, cuando éstos son estimulados con células dendríticas cargadas con los lisados con diferente perfil glucídico. Estos resultados no sólo ponen de manifiesto la importancia de las estructuras manosiladas en la polarización de las respuestas inmune hacia un fenotipo tipo Th2/regulador, sino que, además, validan las glicosidasas inmovilizadas como herramientas útiles en el estudio del rol biológico de las estructuras glucídicas.

Asimismo, se pudo identificar que dos receptores que pueden interactuar con *F. hepatica* e inmunomodular las células dendríticas: DC-SIGN y MGL. Cuando esta tesis dio comienzo, no había información disponible respecto a los CLRs capaces de interactuar con moléculas *F. hepatica*. Sin embargo, con el correr del desarrollo del presente trabajo, varios reportes mostraron la capacidad del parásito de interactuar con diferentes CLRs (Figura 7.1). Por ejemplo, Grighuis *et al* describieron que la interacción de glicoconjugados de *F. hepatica* con DC-SIGN conduce a la inducción de linfocitos T colaboradores foliculares [92]. Sin embargo, si bien los autores de dicho trabajo afirman que este efecto se debe a estructuras glucídicas fucosiladas del parásito, no aportan evidencias que lo sustenten. Por otro lado, los resultados mostrados por Aldridge *et al* sugieren que antígenos tegumentarios de *F. hepatica* son capaces de inducir anergia en linfocitos T CD4<sup>+</sup> a través del MR murino [230]. El trabajo desarrollado durante esta tesis es complementario con estos reportes, y ayuda a poner en evidencia el rol de las estructuras glucídicas en la interacción del parásito con el sistema inmune del hospedero.

En nuestro caso, se encontró que DC-SIGN, un receptor capaz de reconocer estructuras fucosiladas y manosiladas presentes en un lisado total del parásito adulto, induce un programa inmunoregulador en células dendríticas humanas, aumentando la producción de las citoquinas reuladoras IL-10 e IL-27p28 y haciéndolas capaces de promover linfocitos T reguladores/anérgicos. Interesantemente, se ha reportado que un extracto total del parásito es capaz, junto a la estimulación con LPS, de reducir la capacidad de células dendríticas murinas de inducir respuestas alogénicas por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, en un proceso dependiente de IL-27 [234]. Sin embargo, el estudio del rol de DC-SIGN *in vivo* se ve dificultado debido a la presencia de

diferentes ortólogos y no haber un claro homólogo funcional [85]. En nuestro caso, se observó que CD209a participa en la disminución de IL-12/23p40 por células dendríticas murinas estimuladas por LPS. Sin embargo, no participa en la producción de IL-10 ni en su capacidad de inducir respuestas de tipo Th2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de animales infectados. Sin embargo, esto no indica que dicho receptor u otro de los homólogos murinos de DC-SIGN no participen en la inmunomodulación inducida por *F. hepatica*, y experimentos adicionales deben realizarse para estudiar el rol de DC-SIGN durante la infección.

Interesantemente, se ha visto de forma reciente que la señalización a través del MR conduce a linfocitos T anérgicos, por lo que podría actuar en sinergia junto con DC-SIGN para el desarrollo de la rama reguladora que se observa durante la infección por *F. hepatica* (Figura 7.1) [230]. De hecho, el MR (al igual que Dectin-1) puede modular macrófagos presentes en la cavidad peritoneal en respuesta a productos de secreción-excreción, conduciendo a una mayor expresión de IL-10, TGFβ y Arg-1 (Figura 7.1) [77].



**Figure 7.1. Resumen esquemático de las interacciones entre *Fasciola hepatica* y diferentes CLR.** Diversos CLR pueden interactuar con componentes glicosilados presentes en *F. hepatica*, repercutiendo de diferente manera en las respuestas inmunes.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren un rol de MGL en el desarrollo de respuestas tipo Th2 inducidas por el parásito. Se observó como la interacción del antígeno Tn presente en *F. hepatica* con dicho CLR conduce a un aumento en la producción de IL-10 y TNFα, al igual que a una polarización Th2 de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive, particularmente por una disminución en la producción de IFNγ por éstos. Durante la infección por *F. hepatica*, se produce un gran aumento de células CD11c<sup>+</sup> mMGL2<sup>+</sup>, las cuales presentan un repertorio de diversas moléculas

inmunomoduladoras como IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  o Arg-1. Asimismo, estas células al ser estimuladas con un lisado total del parásito en forma inmovilizada, son capaces de disminuir la de IFN $\gamma$  en un cultivo alogénico con linfocitos T CD4<sup>+</sup>, de la misma forma que se observa para células dendríticas humanas.

Interesantemente, la modulación mediada por MGL se observa únicamente cuando se utiliza el extracto parasitario inmovilizado sobre placa, pero no de forma soluble (donde el efecto inmunomodulador es dado por DC-SIGN), lo cual se encuentra en línea con lo reportado previamente [106]. Esto sugiere que que *in vivo* dicho receptor reconoce el antígeno Tn presente en la superficie del parásito. De hecho, se encontró que ligandos de MGL se encuentran presentes en también en un extracto tegumentario de *F. hepatica*.

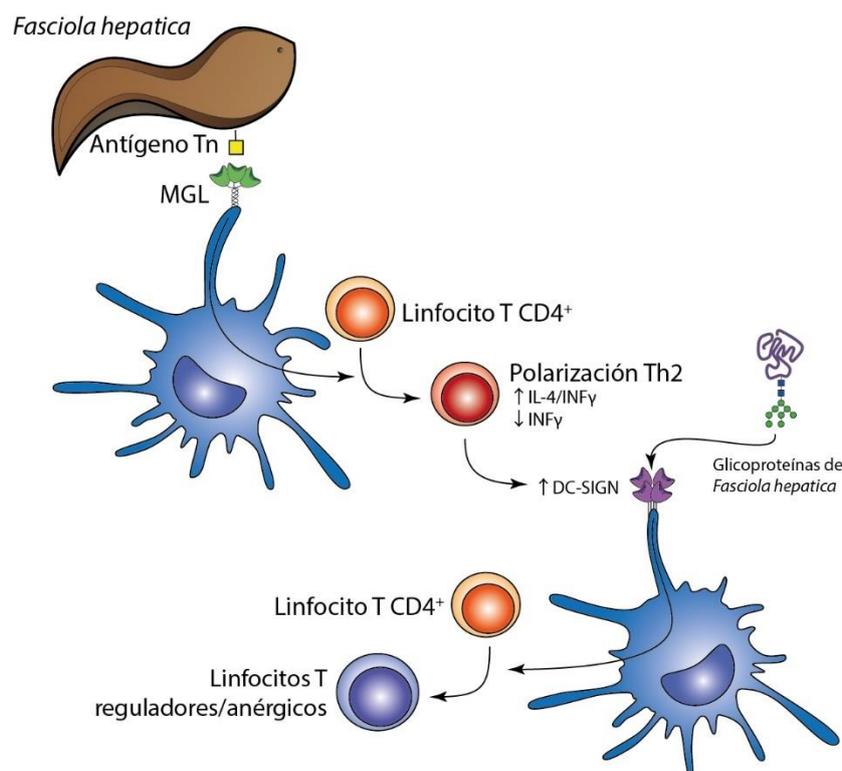
De confirmar la presencia del antígeno Tn en la superficie del parásito, éste presenta potencial para su utilización como blanco de inmunoterapia anti-parasitaria, dada su ausencia en tejidos normales del hospedero [235]. De hecho, el desarrollo de estrategias de inmuno-intervención contra el antígeno Tn ha sido explorada por nuestro grupo de investigación en el contexto de inmunoterapia anti-tumoral [211, 236, 237]. De esta forma, se podría llegar a pensar en la inmunización con glicoproteínas conteniendo el antígeno Tn o en la utilización de anticuerpos monoclonales capaces de desencadenar diferentes funciones efectoras. El desarrollo de una fuerte respuesta inmune contra dicha estructura glucídica permitiría actuar en diferentes niveles contra el parásito, ya sea a través de un ataque directo a la superficie de *F. hepatica* o mediante un enmascaramiento del antígeno Tn por unión de anticuerpos específicos, impidiendo así su unión a MGL, y bloqueando de esta forma la inmunomodulación producida por este CLR.

Resulta interesante observar como los mismos ligandos mostrados de diferente forma a las células dendríticas conducen distintos efectos. Esto puede deberse a la mayor capacidad de entrecruzamiento que se produce al utilizar ligandos inmovilizados y/o a la necesidad de que presenten los diferentes receptores para internalizar los ligandos y conducir a una señalización intracelular. Por otro lado, se ha reportado que la señalización inducida por el MR al interactuar con glicoconjugados de *S. mansoni*, se pierde cuando estos son utilizados de forma inmovilizados sobre placa [83], sugiriendo que este CLR necesita internalizar los ligandos para conducir a una señalización intracelular. Por el contrario, se ha visto que la fagocitosis de ligandos de Dectin-1 reduce su capacidad de inducir citoquinas pro-inflamatorias [238]. De esta forma, la utilización de agregados de micropartículas de  $\beta$ -glucanos conduce a una mayor producción de citoquinas que la utilización de  $\beta$ -glucanos aislados, lo cual es causa directa de la

incapacidad de células dendríticas murinas de fagocitar estructuras de gran tamaño [238]. Estas diferencias podrían resultar de gran importancia para entender como las células del sistema inmune son capaces de reconocer diferentes estructuras y conducir a diferentes efectos. Se podría hipotetizar que estas diferencias se basan en que la incapacidad de internalización de los ligandos podría conducir a una estimulación más duradera que aquellos ligandos que son fagocitados y posteriormente degradados en el interior celular.

Sin embargo, durante la infección por *F. hepatica* el panorama resulta mucho más complejo debido a la presencia de glicoconjugados tanto inmovilizados sobre la superficie del parásito como solubles (como los productos de excreción-secreción). Si a esto le sumamos la creciente evidencia de diferentes CLR's en la interacción con estructuras glicosiladas del parásito, podemos llegar a pensar que la inmunomodulación mostrada durante la infección se construye en base a la interacción con varios receptores, que conducen en su conjunto a una fuerte inducción de respuestas de tipo Th2 y reguladoras.

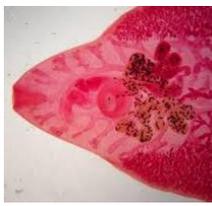
De todas formas, un posible modelo capaz de integrar los diferentes resultados de ésta tesis se muestra en la Figura 7.2. En este modelo se propone que el antígeno Tn presente en la superficie de *F. hepatica*, es capaz de interactuar con células dendríticas a través de MGL, conduciendo a la polarización de linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia Th2. Las citoquinas producidas por estos linfocitos podrían derivar en un aumento de la expresión de DC-SIGN en células dendríticas [239], a través del cual pueden interactuar glicoconjugados de *F. hepatica* por medio de estructuras manosiladas y fucosiladas e inducir respuestas de linfocitos T reguladores/anergicos. Asimismo, las citoquinas Th2, como IL-4 e IL-13, son capaces de aumentar también la expresión del MR [179]. Dado que recientemente se ha reportado que éste induce anergia en linfocitos T, es probable que ambos receptores actúen en conjunto para inducir la rama reguladora observada durante la infección por este parásito.



**Figure 7.2. Hipótesis integradora de los resultados obtenidos en la presente tesis.** Los resultados de este trabajo sugieren la participación de dos receptores en la inmunomodulación inducida por *F. hepatica*: MGL y DC-SIGN. Como forma de integrar la participación de estos receptores, proponemos que el antígeno Tn presente en la superficie de *F. hepatica*, es capaz de interactuar con MGL presente en células dendríticas, modulando su maduración e induciendo la polarización de linfocitos hacia un perfil Th2. Las citoquinas secretadas por estos linfocitos, conducen a un aumento de la expresión de DC-SIGN, que puede unirse a glicoconjugados derivados del parásito, a través de residuos de manosa y fucosa, para inducir linfocitos T reguladores/anérgicos. Se representan únicamente los N-glicanos conteniendo oligomanosa, dado que fueron las estructuras glucídicas identificadas en esta tesis.

Por otro lado, mediante deglicosilación enzimática, se observó que las estructuras manosiladas presentes en el lisado parasitario son necesarias para la inducción de respuestas de tipo Th2. Ésto podría deberse a que glicoproteínas con residuos de manosa presentan péptidos inmunodominantes y su internalización por las células dendríticas depende de receptores específicos para este glúcido, por lo que la demanosilación enzimática del extracto disminuiría su internalización, y por lo tanto habría menos cantidad de estos péptidos inmunodominantes en complejos con MHCII, para ser presentados a linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

En suma, esta tesis pone de manifiesto el rol de las estructuras glucídicas de *Fasciola hepatica* en la modulación inducida durante la infección, sugiriendo la participación de dos receptores: DC-SIGN y MGL.

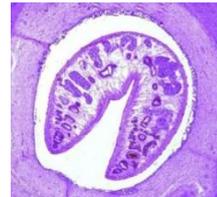
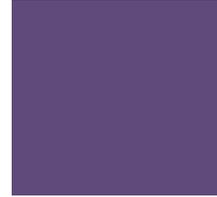


A lo largo de este trabajo de tesis, se utilizó una combinación de diversas estrategias experimentales *in vitro* e *in vivo*, para explorar cómo moléculas glicosiladas de *Fasciola hepatica* son capaces de regular la respuesta inmune del hospedero y, en particular, las células dendríticas, tanto humanas como de murinas. A partir de los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones:

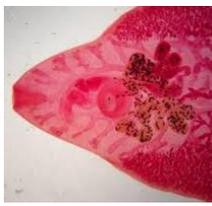
- Los glúcidos de *F. hepatica* participan en la síntesis de IL-4 e IL-10 por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, al igual que en la modulación de la maduración de células dendríticas murinas inducida por LPS. Este efecto sería mediado por reconocimiento a través de un CLR específico de manosa y del reclutamiento de SHP2.
- Se lograron sintetizar derivados inmovilizados funcionales de las enzimas  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y  $\alpha$ -manosidasa de *Canavalia ensiformis*. Su utilización en la deligilación específica de un lisado total del parásito adulto nos permitió observar la importancia de los residuos manosilados en el desarrollo de respuestas inmunes de tipo Th2.
- Los residuos manosilados y fucosilados presentes en *F. hepatica* interaccionan con DC-SIGN presente en células dendríticas humanas para aumentar su producción de IL-10 e IL-27 inducida por ligandos de TLR, al igual que para inducir su capacidad de desarrollar linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores/naive.
- El antígeno Tn presente en *F. hepatica* es capaz de interaccionar con MGL y desencadenar un programa inmunoregulator en células dendríticas, caracterizado por un aumento en la síntesis de IL-10 y TNF $\alpha$  inducido por ligandos de TLR y en la capacidad de polarizar linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive hacia un fenotipo Th2.



# Capítulo VIII: Bibliografía







1. Hotez, P.J., et al., *Helminth infections: the great neglected tropical diseases*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1311-21.
2. Spithill, T., et al., *Chapter 28. Prospects for immunoprophylaxis against Fasciola hepatica (liver fluke)*. Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines, ed. C.R. Caffrey 2012, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
3. Torgerson, P., et al., *Epidemiology and control* 1999: Fasciolosis.
4. Mas-Coma, S., et al., *Chapter 2. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control*. Adv Parasitol, 2009. **69**: p. 41-146.
5. World Health Organization, *Report of the WHO Informal Meeting on Use of Triclabendazole in Fascioliasis Control*, 2006: Geneva, Switzerland.
6. Molina-Hernandez, V., et al., *Fasciola hepatica vaccine: we may not be there yet but we're on the right road*. Vet Parasitol, 2015. **208**(1-2): p. 101-11.
7. Andrews, S., *The Life Cycle of Fasciola Hepatica*, in *Fasciolosis* 1999, CAB International.
8. Boray, J.C., *Experimental Fascioliasis in Australia*, in *Adv Parasitol*, D. Ben, Editor 1969, Academic Press. p. 95-210.
9. Nari, A.C., H.; Acosta, D.; Solari, M.A.; Petracchia, C., *Efecto del atemperatura en el desarrollo de Fasciola hepática en su huésped intermediario Lymnaea viatrix D'Orbigny*. Veterinaria, 1983.
10. Keiser, J., et al., *Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis*. Expert Opin Investig Drugs, 2005. **14**(12): p. 1513-26.
11. Coles, G.C., *Anthelmintic resistance--looking to the future: a UK perspective*. Res Vet Sci, 2005. **78**(2): p. 99-108.
12. Fairweather, I., *Triclabendazole progress report, 2005-2009: an advancement of learning?* J Helminthol, 2009. **83**(2): p. 139-50.
13. McSorley, H.J., et al., *Helminth infections and host immune regulation*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(4): p. 585-608.
14. Flynn, R.J., et al., *Coordinating innate and adaptive immunity in Fasciola hepatica infection: implications for control*. Vet Parasitol, 2010. **169**(3-4): p. 235-40.
15. Fainboim, L.G., J., *Introducción a la inmunología humana* 2011: Editorial Médica Panamericana.
16. Lanier, L.L., *Shades of grey — the blurring view of innate and adaptive immunity*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(2): p. 73-74.
17. Eberl, G., et al., *Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology*. Science, 2015. **348**(6237): p. aaa6566.
18. Wencker, M., et al., *Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness*. Nat Immunol, 2014. **15**(1): p. 80-7.
19. Pühr, S., et al., *Dendritic cell development—History, advances, and open questions*. Semin Immunol, 2016.
20. Dalod, M., et al., *Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming*. EMBO J, 2014. **33**(10): p. 1104-16.
21. Palucka, A.K., et al., *The Basis of Oncoimmunology*. Cell, 2016. **164**(6): p. 1233-47.
22. Murphy, K.T., P.; Walport, M., *Janeway's Immunobiology. 7th Edition*. 2009: McGraw-Hill.
23. Iwasaki, A., et al., *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nat Immunol, 2015. **16**(4): p. 343-53.
24. Raker, V.K., et al., *Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 569.
25. McSorley, H.J., et al., *Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators*. Int J Parasitol, 2013. **43**(3-4): p. 301-10.

26. van Die, I., et al., *Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response?* Glycobiology, 2010. **20**(1): p. 2-12.
27. Finlay, C.M., et al., *Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases.* Immunol Rev, 2014. **259**(1): p. 206-30.
28. O'Neill, S.M., et al., *Fasciola hepatica infection downregulates Th1 responses in mice.* Parasite Immunol, 2000. **22**(3): p. 147-55.
29. Flynn, R.J., et al., *Co-Infection of cattle with Fasciola hepatica and Mycobacterium bovis- immunological consequences.* Transbound Emerg Dis, 2009. **56**(6-7): p. 269-74.
30. Hewitson, J.P., et al., *Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity.* Mol Biochem Parasitol, 2009. **167**(1): p. 1-11.
31. Robinson, M.W., et al., *Fasciola hepatica: the therapeutic potential of a worm secretome.* Int J Parasitol, 2013. **43**(3-4): p. 283-91.
32. Flynn, R.J., et al., *Experimental Fasciola hepatica infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis.* Infect Immun, 2007. **75**(3): p. 1373-81.
33. Claridge, J., et al., *Fasciola hepatica is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle.* Nat Commun, 2012. **3**: p. 853.
34. Smith, A., et al., *Fasciola hepatica: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin.* Int J Parasitol, 1993. **23**: p. 977-83.
35. Berasain, P., et al., *Fasciola hepatica: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced.* Exp Parasitol, 2000. **94**: p. 99-110.
36. Carmona, C., et al., *Cathepsin L proteinase secreted by Fasciola hepatica in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles.* Mol Biochem Parasitol, 1993: p. 9-17.
37. Erb, K.J., *Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases?* Trends Immunol, 2009. **30**(2): p. 75-82.
38. McKay, D.M., *The therapeutic helminth?* Trends Parasitol, 2009. **25**(3): p. 109-14.
39. Walsh, K.P., et al., *Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses.* J Immunol, 2009. **183**(3): p. 1577-86.
40. Osada, Y., et al., *Parasitic helminths: new weapons against immunological disorders.* J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 743758.
41. Zaccone, P., et al., *Vaccine against autoimmune disease: can helminths or their products provide a therapy?* Curr Opin Immunol, 2013. **25**(3): p. 418-23.
42. Elliott, D.E., et al., *Colonization with Heligmosomoides polygyrus Suppresses Mucosal IL-17 Production.* The Journal of Immunology, 2008. **181**(4): p. 2414-2419.
43. Hubner, M.P., et al., *Helminth protection against autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice is independent of a type 2 immune shift and requires TGF-beta.* J Immunol, 2012. **188**(2): p. 559-68.
44. Wilson, M.S., et al., *Helminth-induced CD19+CD23hi B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation.* Eur J Immunol, 2010. **40**(6): p. 1682-96.
45. Correale, J., et al., *Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis.* Ann Neurol, 2007. **61**(2): p. 97-108.
46. Correale, J., et al., *The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis.* J Neuroimmunol, 2011. **233**(1-2): p. 6-11.
47. Dalton, J.P., et al., *Immunomodulatory molecules of Fasciola hepatica: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development.* Vet Parasitol, 2013. **195**(3-4): p. 272-85.
48. Finlay, C.M., et al., *Helminth Products Protect against Autoimmunity via Innate Type 2 Cytokines IL-5 and IL-33, Which Promote Eosinophilia.* J Immunol, 2016. **196**(2): p. 703-14.

49. Maizels, R.M., et al., *Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 733-44.
50. Ferret-Bernard, S., et al., *Proteomic profiling reveals that Th2-inducing dendritic cells stimulated with helminth antigens have a 'limited maturation' phenotype*. Proteomics, 2008. **8**(5): p. 980-93.
51. Perrigoue, J.G., et al., *On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites*. Cell Microbiol, 2008. **10**(9): p. 1757-64.
52. MacDonald, A.S., et al., *Alarming dendritic cells for Th2 induction*. J Exp Med, 2008. **205**(1): p. 13-7.
53. Falcon, C., et al., *Excretory-secretory products (ESP) from Fasciola hepatica induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells*. Vet Immunol Immunopathol, 2010. **137**(1-2): p. 36-46.
54. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.
55. Hamilton, C.M., et al., *The Fasciola hepatica tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function*. Infect Immun, 2009. **77**(6): p. 2488-98.
56. Carranza, F., et al., *Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collagen-induced arthritis through Foxp3+ regulatory T cells*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40356.
57. Falcon, C.R., et al., *Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with Fasciola hepatica antigens and lipopolysaccharides confers protection against fasciolosis in mice*. J Infect Dis, 2012. **205**(3): p. 506-14.
58. Frick, J.S., et al., *Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(1): p. 19-24.
59. Dowling, D.J., et al., *Major secretory antigens of the helminth Fasciola hepatica activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses*. Infect Immun, 2010. **78**(2): p. 793-801.
60. Varki, A.S., N., *Chapter 1: Historical Background and Overview*, in *Essentials of Glycobiology. 2nd edition.*, A. Varki, Editor 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY).
61. van Kooyk, Y., et al., *Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 593-601.
62. Pinho, S.S., et al., *Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(9): p. 540-55.
63. Tran, D.T., et al., *Mucin-type O-glycosylation during development*. J Biol Chem, 2013. **288**(10): p. 6921-9.
64. Rodrigues, A., et al., *Parasite Glycobiology: A Bittersweet Symphony*. PLoS Pathog, 2015. **11**(11): p. e1005169.
65. Renuka, M., *Membrane Glycolipids: Functional Heterogeneity: A Review*. Biochemistry & Analytical Biochemistry, 2012.
66. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4): p. 43R-56R.
67. Hansen, L., et al., *A glycome mutation map for discovery of diseases of glycosylation*. Glycobiology, 2015. **25**(2): p. 211-24.
68. Tawill, S., et al., *Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 398-407.
69. Bhargava, P., et al., *Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways*. Nat Med, 2012. **18**(11): p. 1665-72.

70. van Liempt, E., et al., *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol*, 2007. **44**(10): p. 2605-15.
71. Everts, B., et al., *Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor*. *J Exp Med*, 2012. **209**(10): p. 1753-67, S1.
72. McInnes, I.B., et al., *A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62*. *J Immunol*, 2003. **171**(4): p. 2127-33.
73. Rzepecka, J., et al., *The helminth product, ES-62, protects against airway inflammation by resetting the Th cell phenotype*. *Int J Parasitol*, 2013. **43**(3-4): p. 211-23.
74. Faveeuw, C., et al., *Schistosome N-glycans containing core alpha 3-fucose and core beta 2-xylose epitopes are strong inducers of Th2 responses in mice*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(5): p. 1271-81.
75. Flynn, R.J., et al., *Possible role for Toll-like receptors in interaction of Fasciola hepatica excretory/secretory products with bovine macrophages*. *Infect Immun*, 2008. **76**(2): p. 678-84.
76. Serradell, M.C., et al., *Excretory-secretory products from Fasciola hepatica induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2007. **117**(3-4): p. 197-208.
77. Guasconi, L., et al., *C-type lectins on macrophages participate in the immunomodulatory response to Fasciola hepatica products*. *Immunology*, 2011. **133**(3): p. 386-96.
78. Zelensky, A.N., et al., *The C-type lectin-like domain superfamily*. *FEBS J*, 2005. **272**(24): p. 6179-217.
79. Sancho, D., et al., *Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 491-529.
80. Osorio, F., et al., *Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense*. *Immunity*, 2011. **34**(5): p. 651-64.
81. Harn, D.A., et al., *Modulation of host immune responses by helminth glycans*. *Immunol Rev*, 2009. **230**(1): p. 247-57.
82. Klaver, E.J., et al., *Trichuris suis-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated*. *Int J Parasitol*, 2013. **43**(3-4): p. 191-200.
83. Klaver, E.J., et al., *Schistosoma mansoni Soluble Egg Antigens Induce Expression of the Negative Regulators SOCS1 and SHP1 in Human Dendritic Cells via Interaction with the Mannose Receptor*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0124089.
84. Toet, H., et al., *Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities*. *Int J Parasitol*, 2014: p. S0020-7519(14)00197-0 [pii] 10.1016/j.ijpara.2014.07.011.
85. Garcia-Vallejo, J.J., et al., *The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men*. *Trends Immunol*, 2013. **34**(10): p. 482-6.
86. van Liempt, E., et al., *Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(26): p. 6123-31.
87. Geijtenbeek, T.B., et al., *Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(7): p. 465-79.
88. Geijtenbeek, T.B., et al., *Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity*. *Future Microbiol*, 2009. **4**(7): p. 879-90.
89. Gringhuis, S.I., et al., *Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter pylori*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(10): p. 1081-8.

90. Regan, A.D., et al., *Utilization of DC-SIGN for entry of feline coronaviruses into host cells*. J Virol, 2008. **82**(23): p. 11992-6.
91. de Jong, M.A., et al., *Dendritic cells mediate herpes simplex virus infection and transmission through the C-type lectin DC-SIGN*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 10): p. 2398-409.
92. Gringhuis, S.I., et al., *Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5074.
93. Gagliardi, M.C., et al., *Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN-dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(1): p. 106-13.
94. Cambi, A., et al., *Dendritic cell interaction with Candida albicans critically depends on N-linked mannan*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20590-9.
95. van Gisbergen, K.P., et al., *Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*. Cancer Res, 2005. **65**(13): p. 5935-44.
96. Lefevre, L., et al., *The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to Leishmania infantum*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 1038-49.
97. van Stijn, C.M., et al., *Schistosoma mansoni worm glycolipids induce an inflammatory phenotype in human dendritic cells by cooperation of TLR4 and DC-SIGN*. Mol Immunol, 2010. **47**(7-8): p. 1544-52.
98. Meyer, S., et al., *DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-LewisY glycolipids of Schistosoma mansoni cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37349-59.
99. Phongsisay, V., *The immunobiology of Campylobacter jejuni: Innate immunity and autoimmune diseases*. Immunobiology, 2016. **221**(4): p. 535-43.
100. van Kooyk, Y., et al., *Novel insights into the immunomodulatory role of the dendritic cell and macrophage-expressed C-type lectin MGL*. Immunobiology, 2015. **220**(2): p. 185-92.
101. Singh, S.K., et al., *Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: distinct glycan specificities and tumor binding properties*. Mol Immunol, 2009. **46**(6): p. 1240-9.
102. Zizzari, I.G., et al., *MGL Receptor and Immunity: When the Ligand Can Make the Difference*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 450695.
103. van Vliet, S.J., et al., *Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 577-85.
104. van Vliet, S.J., et al., *Human T cell activation results in extracellular signal-regulated kinase (ERK)-calcineurin-dependent exposure of Tn antigen on the cell surface and binding of the macrophage galactose-type lectin (MGL)*. J Biol Chem, 2013. **288**(38): p. 27519-32.
105. van Vliet, S.J., et al., *The C-type lectin macrophage galactose-type lectin impedes migration of immature APCs*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3148-55.
106. van Vliet, S.J., et al., *MGL signaling augments TLR2-mediated responses for enhanced IL-10 and TNF-alpha secretion*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(2): p. 315-23.
107. Li, D., et al., *Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells*. J Exp Med, 2012. **209**(1): p. 109-21.
108. van Sorge, N.M., et al., *N-glycosylated proteins and distinct lipooligosaccharide glycoforms of Campylobacter jejuni target the human C-type lectin receptor MGL*. Cell Microbiol, 2009. **11**(12): p. 1768-81.

109. Kumamoto, Y., et al., *CD301b(+) dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity*. *Immunity*, 2013. **39**(4): p. 733-43.
110. Murakami, R., et al., *A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e73270.
111. Yamada, K., et al., *Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use*. *J Pharm Biomed Anal*, 2011. **55**(4): p. 702-27.
112. Mulloy, B.H., G.W.; Stanley, P., *Chapter 47: Structural Analysis of Glycans*, in *Essentials of Glycobiology.*, C.R. Varki A, Esko JD, et al., Editor 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
113. Zhang, Y., et al., *Combining various strategies to increase the coverage of the plant cell wall glycoproteome*. *Phytochemistry*, 2011. **72**(10): p. 1109-23.
114. Theodoropoulos, G., et al., *The role of mucins in host-parasite interactions: Part II - helminth parasites*. *Trends Parasitol*, 2001. **17**: p. 130-5.
115. Acosta-Serrano, A., et al., *The mucin-like glycoprotein super-family of Trypanosoma cruzi: structure and biological roles*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 2001. **114**: p. 143-150.
116. Klibanov, A.M., *Stabilization of enzymes against thermal inactivation*. *Adv Appl Microbiol*, 1983. **29**: p. 1-28.
117. Brena, B., et al., *Immobilization of enzymes: a literature survey*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1051**: p. 15-31.
118. Krenkova, J., et al., *Oriented immobilization of peptide-N-glycosidase F on a monolithic support for glycosylation analysis*. *J Chromatogr A*, 2013. **1322**: p. 54-61.
119. Krenkova, J., et al., *Multidimensional system enabling deglycosylation of proteins using a capillary reactor with peptide-N-glycosidase F immobilized on a porous polymer monolith and hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry of glycans*. *J Chromatogr A*, 2009. **1216**(15): p. 3252-9.
120. Garcia-Junceda, E., et al., *Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades*. *Bioorg Med Chem*, 2004. **12**(8): p. 1817-34.
121. Giacomini, C., et al., *Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from Kluyveromyces lactis on silica and agarose: comparison of different methods*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998. **4**(5-6): p. 313-327.
122. Netto, C.G.C.M., et al., *Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013. **85-86**: p. 71-92.
123. Dragosits, M., et al., *Recombinant Aspergillus beta-galactosidases as a robust glycomic and biotechnological tool*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014. **98**(8): p. 3553-67.
124. Zeleny, R., et al., *A capillary electrophoretic study on the specificity of beta-galactosidases from Aspergillus oryzae, Escherichia coli, Streptococcus pneumoniae, and Canavalia ensiformis (jack bean)*. *Anal Biochem*, 1997. **246**(1): p. 96-101.
125. Tanaka, Y., et al., *Purification and properties of beta-galactosidase from Aspergillus oryzae*. *J Biochem*, 1975. **77**(1?): p. 241-7.
126. Li, Y.T., *Studies on the glycosidases in jack bean meal. I. Isolation and properties of alpha-mannosidase*. *J Biol Chem*, 1967. **242**(23): p. 5474-80.
127. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
128. van Vliet, S.J., et al., *Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells*. *Int Immunol*, 2005. **17**(5): p. 661-9.
129. Bloem, K., et al., *DCIR interacts with ligands from both endogenous and pathogenic origin*. *Immunol Lett*, 2014. **158**(1-2): p. 33-41.

130. Garcia-Vallejo, J.J., et al., *Approach for defining endogenous reference genes in gene expression experiments*. *Anal Biochem*, 2004. **329**(2): p. 293-9.
131. Garcia-Vallejo, J.J., et al., *CNS myelin induces regulatory functions of DC-SIGN-expressing, antigen-presenting cells via cognate interaction with MOG*. *J Exp Med*, 2014. **211**(7): p. 1465-83.
132. Kalay, H., et al., *Enhanced glycan nanoprofiling by weak anion exchange preparative chromatography, mild acid desialylation, and nanoliquid chromatography-mass spectrometry with nanofluorescence detection*. *Electrophoresis*, 2013. **34**(16): p. 2350-6.
133. Georgieva, K., et al., *Fasciola hepatica miracidia: lectin binding and stimulation of in vitro miracidium-to-sporocyst transformation*. *Acta Parasitol*, 2012. **57**(1): p. 46-52.
134. McAllister, H., et al., *Using lectins to identify hidden antigens in Fasciola hepatica*. *J Helminthol.*, 2011. **85**: p. 121-127.
135. Farahnak, A., et al., *Carbohydrate Detection and Lectin Isolation from Tegumental Tissue of Fasciola hepatica*. *Iran J Parasitol*, 2010. **5**(1): p. 20-4.
136. Wuhrer, M., et al., *The parasitic trematode Fasciola hepatica exhibits mammalian-type glycolipids as well as Gal(beta1-6)Gal-terminating glycolipids that account for cestode serological cross-reactivity*. *Glycobiology*, 2004. **14**: p. 115-126.
137. Freire, T., et al., *Mucin type O-glycosylation in Fasciola hepatica: characterization of carcinoma associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity*. *Int. J. Parasitology*, 2003. **33**: p. 47-56.
138. Flynn, R., et al., *The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental Fasciola hepatica infection*. *Int J Parasitol*, 2008. **38**: p. 1673-1680.
139. Liu, Z., et al., *Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review*. *Int J Med Sci*, 2014. **11**(9): p. 925-35.
140. Tundup, S., et al., *Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans*. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1253**: p. E1-E13.
141. Vazquez-Mendoza, A., et al., *Parasitic infections: a role for C-type lectins receptors*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 456352.
142. Lin, G., et al., *Further structural characterization of the Echinococcus granulosus laminated layer carbohydrates: the blood-antigen P1-motif gives rise to branches at different points of the O-glycan chains*. *Glycobiology*, 2013. **23**(4): p. 438-52.
143. Yamano, K., et al., *Galalpha1-4Galbeta1-3GalNAc is the dominant epitope of Em2 antigen, the mucin-type glycoprotein from Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Res*, 2012. **111**(2): p. 795-805.
144. Paschinger, K., et al., *Mass spectrometric analysis of the immunodominant glycan epitope of Echinococcus granulosus antigen Ag5*. *Int J Parasitol*, 2012. **42**(3): p. 279-85.
145. Frank, S., et al., *Structural characterization of Schistosoma mansoni adult worm glycosphingolipids reveals pronounced differences with those of cercariae*. *Glycobiology*, 2012. **22**(5): p. 676-95.
146. Wuhrer, M., et al., *Schistosoma mansoni cercarial glycolipids are dominated by Lewis X and pseudo-Lewis Y structures*. *Glycobiology*, 2000. **10**(1): p. 89-101.
147. Wuhrer, M., et al., *Repeats of LacdiNAc and fucosylated LacdiNAc on N-glycans of the human parasite Schistosoma mansoni*. *FEBS J*, 2006. **273**(2): p. 347-61.
148. Khoo, K.H., et al., *Glycoconjugates from parasitic helminths: structure diversity and immunobiological implications*. *Adv Exp Med Biol*, 2001. **491**: p. 185-205.
149. Osinaga, E., et al., *Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy*. *FEBS Lett*, 2000. **469**(1): p. 24-8.

150. Vukman, K., et al., *Fasciola hepatica tegumental coat impairs mast cells' ability to drive Th1 immune responses*. J Immunol., 2013. **190**: p. 2873-9.
151. Helft, J., et al., *GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells*. Immunity, 2015. **42**(6): p. 1197-211.
152. Plato, A., et al., *C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways*. Int Rev Immunol, 2013. **32**(2): p. 134-56.
153. McVeigh, P., et al., *Fasciola hepatica virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective*. Microbes Infect, 2012. **14**(4): p. 301-10.
154. Moser, B., et al., *Chemokines: role in inflammation and immune surveillance*. Ann Rheum Dis, 2004. **63 Suppl 2**: p. ii84-ii89.
155. Steinman, R., *Decisions about dendritic cells: past, present, and future*. Annu Rev Immunol., 2012. **30**: p. 1-22.
156. Noss, E., et al., *Mycobacterium tuberculosis inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages*. Cell Immunol, 2000. **201**: p. 63-74.
157. Lapaque, N., et al., *Salmonella regulates polyubiquitination and surface expression of MHC class II antigens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**: p. 14052-14057.
158. Massoud, A.H., et al., *Dendritic cell immunoreceptor: a novel receptor for intravenous immunoglobulin mediates induction of regulatory T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(3): p. 853-63 e5.
159. Kanazawa, N., et al., *DCIR acts as an inhibitory receptor depending on its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(2): p. 261-6.
160. Richard, M., et al., *Granulocyte macrophage-colony stimulating factor reduces the affinity of SHP-2 for the ITIM of CLECSF6 in neutrophils: a new mechanism of action for SHP-2*. Mol Immunol, 2006. **43**(10): p. 1716-21.
161. Meyer-Wentrup, F., et al., *Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4245-53.
162. Meyer-Wentrup, F., et al., *DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(3): p. 518-25.
163. Schraml, B.U., et al., *Defining dendritic cells*. Curr Opin Immunol, 2015. **32**: p. 13-20.
164. Poulin, L.F., et al., *DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues*. Blood, 2012. **119**(25): p. 6052-62.
165. Heath, W.R., et al., *Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens*. Immunol Rev, 2004. **199**: p. 9-26.
166. Dudziak, D., et al., *Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo*. Science, 2007. **315**(5808): p. 107-11.
167. Vigerust, D.J., et al., *Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions*. Trends Microbiol, 2007. **15**(5): p. 211-8.
168. Tan, F.Y., et al., *Sugar coating: bacterial protein glycosylation and host-microbe interactions*. Trends Biochem Sci, 2015. **40**(7): p. 342-50.
169. Zhang, D.H., et al., *Effect of poly(vinyl acetate-acrylamide) microspheres properties and steric hindrance on the immobilization of Candida rugosa lipase*. Bioresour Technol, 2012. **124**: p. 233-6.
170. Lei, Z., et al., *Preparation and properties of immobilized pectinase onto the amphiphilic PS-b-PAA diblock copolymers*. J Biotechnol, 2007. **128**(1): p. 112-9.
171. Xie, W., et al., *Enzymatic Production of Biodiesel from Soybean Oil by Using Immobilized Lipase on Fe3O4/Poly(styrene-methacrylic acid) Magnetic Microsphere as a Biocatalyst*. Energy & Fuels, 2014. **28**(4): p. 2624-2631.

172. Goncalves, L.R., et al., *Influence of mass transfer limitations on the enzymatic synthesis of beta-lactam antibiotics catalyzed by penicillin G acylase immobilized on glioxil-agarose*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2008. **31**(5): p. 411-8.
173. Nilsson, B., et al., *Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(11): p. 4545-53.
174. Baenziger, J.U., et al., *Structure of the complex oligosaccharides of fetuin*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(3): p. 789-95.
175. Yen, M.H., et al., *Recognition roles of the carbohydrate glycotopes of human and bovine lactoferrins in lectin-N-glycan interactions*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1810**(2): p. 139-49.
176. Groot, F., et al., *Lactoferrin prevents dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission by blocking the DC-SIGN--gp120 interaction*. *J Virol*, 2005. **79**(5): p. 3009-15.
177. Maksimainen, M.M., et al., *The crystal structure of acidic beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae**. *Int J Biol Macromol*, 2013. **60**: p. 109-15.
178. Kumar, A., et al., *Jack bean alpha-mannosidase (Jbalpha-man): tolerance to alkali, chelating and reducing agents and energetics of catalysis and inhibition*. *Int J Biol Macromol*, 2011. **49**(5): p. 1066-71.
179. Martinez-Pomares, L., *The mannose receptor*. *J Leukoc Biol*, 2012. **92**(6): p. 1177-86.
180. Foley, K.J., et al., *Detection of lectin-glycan interaction using high resolution surface plasmon resonance*. *Analyst*, 2008. **133**(6): p. 744-6.
181. Giacomini, C., et al., *Chemical thiolation strategy: A determining factor in the properties of thiol-bound biocatalysts*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2007. **25**(5): p. 373-381.
182. Argueta-Donohue, J., et al., *Differential phagocytosis of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells*. *Microbiol Immunol*, 2016. **60**(6): p. 369-81.
183. Garcia-Vallejo, J.J., et al., *DC-SIGN mediates adhesion and rolling of dendritic cells on primary human umbilical vein endothelial cells through LewisY antigen expressed on ICAM-2*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(8): p. 2359-69.
184. Fehres, C.M., et al., *Cross-presentation through langerin and DC-SIGN targeting requires different formulations of glycan-modified antigens*. *J Control Release*, 2015. **203**: p. 67-76.
185. van Kooyk, Y., et al., *Glycan-based DC-SIGN targeting vaccines to enhance antigen cross-presentation*. *Mol Immunol*, 2013. **55**(2): p. 143-5.
186. Bloem, K., et al., *Interaction of the Capsular Polysaccharide A from *Bacteroides fragilis* with DC-SIGN on Human Dendritic Cells is Necessary for Its Processing and Presentation to T Cells*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 103.
187. van Vliet, S.J., et al., *Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function*. *Trends Immunol*, 2008. **29**(2): p. 83-90.
188. Ravidà, A., et al., *Fasciola hepatica Surface Coat Glycoproteins Contain Mannosylated and Phosphorylated N-glycans and Exhibit Immune Modulatory Properties Independent of the Mannose Receptor*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016. **10**(4): p. e0004601.
189. Conde, P., et al., *DC-SIGN(+) Macrophages Control the Induction of Transplantation Tolerance*. *Immunity*, 2015. **42**(6): p. 1143-58.
190. Feinberg, H., et al., *Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR*. *Science*, 2001. **294**(5549): p. 2163-6.
191. van Die, I., et al., *The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x*. *Glycobiology*, 2003. **13**(6): p. 471-8.

192. Gringhuis, S.I., et al., *C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB*. *Immunity*, 2007. **26**(5): p. 605-16.
193. Rodriguez, E., et al., *Glycans from Fasciola hepatica Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced Maturation of Dendritic Cells*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. **9**(12): p. e0004234.
194. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 683-765.
195. Dennis, K.L., et al., *Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer*. *Curr Opin Oncol*, 2013. **25**(6): p. 637-45.
196. Murugaiyan, G., et al., *IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells*. *J Immunol*, 2009. **183**(4): p. 2435-43.
197. Oertli, M., et al., *DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine Helicobacter pylori-specific immune tolerance, and asthma protection*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(3): p. 1082-96.
198. Denda-Nagai, K., et al., *Distribution and function of macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b): efficient uptake and presentation of glycosylated antigens by dendritic cells*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(25): p. 19193-204.
199. Terrazas, C.A., et al., *Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway*. *FASEB J*, 2013. **27**(11): p. 4547-60.
200. van Vliet, S.J., et al., *Variation of Neisseria gonorrhoeae lipooligosaccharide directs dendritic cell-induced T helper responses*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(10): p. e1000625.
201. Vukman, K.V., et al., *Mannose receptor and macrophage galactose-type lectin are involved in Bordetella pertussis mast cell interaction*. *J Leukoc Biol*, 2013. **94**(3): p. 439-48.
202. Takada, A., et al., *Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry*. *J Virol*, 2004. **78**(6): p. 2943-7.
203. Upham, J.P., et al., *Macrophage receptors for influenza A virus: role of the macrophage galactose-type lectin and mannose receptor in viral entry*. *J Virol*, 2010. **84**(8): p. 3730-7.
204. Meevissen, M.H., et al., *Specific glycan elements determine differential binding of individual egg glycoproteins of the human parasite Schistosoma mansoni by host C-type lectin receptors*. *Int J Parasitol*, 2012. **42**(3): p. 269-77.
205. Kleijwegt, F.S., et al., *Critical role for TNF in the induction of human antigen-specific regulatory T cells by tolerogenic dendritic cells*. *J Immunol*, 2010. **185**(3): p. 1412-8.
206. Lin, H.H., et al., *F4/80: the macrophage-specific adhesion-GPCR and its role in immunoregulation*. *Adv Exp Med Biol*, 2010. **706**: p. 149-56.
207. Segura, E., et al., *Inflammatory dendritic cells in mice and humans*. *Trends Immunol*, 2013. **34**(9): p. 440-5.
208. Kool, M., et al., *Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells*. *J Exp Med*, 2008. **205**(4): p. 869-82.
209. Hammad, H., et al., *Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen*. *J Exp Med*, 2010. **207**(10): p. 2097-111.
210. Plantinga, M., et al., *Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen*. *Immunity*, 2013. **38**(2): p. 322-35.
211. Freire, T., et al., *Tn glycosylation of the MUC6 protein modulates its immunogenicity and promotes the induction of Th17-biased T cell responses*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(10): p. 7797-811.

212. Williams, J.W., et al., *Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2990.
213. Gao, Y., et al., *Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells*. Immunity, 2013. **39**(4): p. 722-32.
214. Suzuki, S., et al., *Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b<sup>high</sup>CD8 $\alpha$ -dendritic cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 8981-6.
215. Satoh, T., et al., *The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 936-44.
216. Lee, C.G., et al., *A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells*. Mol Immunol, 2009. **46**(4): p. 613-21.
217. Zheng, Y., et al., *Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses*. Nature, 2009. **458**(7236): p. 351-6.
218. Ahyi, A.N., et al., *IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 1598-606.
219. Cretney, E., et al., *The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells*. Nat Immunol, 2011. **12**(4): p. 304-11.
220. Pesce, J.T., et al., *Retnla (relmalphafizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000393.
221. Nair, M.G., et al., *Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 385-94.
222. Rodriguez, P.C., et al., *L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1568-73.
223. Steinman, R.M., et al., *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
224. Gerdes, N., et al., *Co-stimulatory molecules in and beyond co-stimulation - tipping the balance in atherosclerosis?* Thromb Haemost, 2011. **106**(5): p. 804-13.
225. Daneshmandi, S., et al., *PDL-1/PDL-2 blockade in mice dendritic cells by RNAi techniques to induce antitumor immunity*. Immunotherapy, 2015. **7**(11): p. 1145-58.
226. Appay, V., et al., *RANTES: a versatile and controversial chemokine*. Trends Immunol, 2001. **22**(2): p. 83-7.
227. Kocherscheidt, L., et al., *Echinococcus multilocularis: inflammatory and regulatory chemokine responses in patients with progressive, stable and cured alveolar echinococcosis*. Exp Parasitol, 2008. **119**(4): p. 467-74.
228. Pecinali, N.R., et al., *Influence of murine Toxocara canis infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels*. Vet Parasitol, 2005. **134**(1-2): p. 121-30.
229. Semnani, R.T., et al., *Brugia malayi microfilariae induce cell death in human dendritic cells, inhibit their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4+ T cells*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1950-60.
230. Aldridge, A., et al., *Fasciola hepatica tegumental antigens induce anergic-like T cells via dendritic cells in a mannose receptor-dependent manner*. Eur J Immunol, 2016. **46**(5): p. 1180-92.
231. World Health Organization, *Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis*. 2004.
232. Diaz, A., et al., *Understanding the laminated layer of larval Echinococcus II: immunology*. Trends Parasitol, 2011. **27**(6): p. 264-73.
233. Cvetkovic, J., et al., *Glycans expressed on Trichinella spiralis excretory-secretory antigens are important for anti-inflammatory immune response polarization*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2014. **37**(5-6): p. 355-67.

234. Falcon, C.R., et al., *Fasciola hepatica* Kunitz type molecule decreases dendritic cell activation and their ability to induce inflammatory responses. *PLoS One*, 2014. **9**(12): p. e114505.
235. Cornelissen, L.A., et al., *A Bitter Sweet Symphony: Immune Responses to Altered O-glycan Epitopes in Cancer*. *Biomolecules*, 2016. **6**(2).
236. Freire, T., et al., *Enzymatic large-scale synthesis of MUC6-Tn glycoconjugates for antitumor vaccination*. *Glycobiology*, 2006. **16**(5): p. 390-401.
237. Freire, T., et al., *Glycosidic Tn-based vaccines targeting dermal dendritic cells favor germinal center B-cell development and potent antibody response in the absence of adjuvant*. *Blood*, 2010. **116**(18): p. 3526-36.
238. Rosas, M., et al., *The induction of inflammation by dectin-1 in vivo is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis*. *J Immunol*, 2008. **181**(5): p. 3549-57.
239. Relloso, M., et al., *DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents*. *J Immunol*, 2002. **168**(6): p. 2634-43.