Cátedra de Inmunología, Instituto de Higiene

Universidad de la República

Capa laminar de Echinococcus granulosus:

caracterización in vivo de sus efectos sobre las células

dendríticas locales

Analía Oleggini Tesina de grado, Licenciatura en Bioquímica Tutora: Cecilia Casaravilla Co-Tutora: Leticia Grezzi Agosto 2024

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me ayudaron y acompañaron, no sólo durante la tesina, sino durante toda la carrera. Después de mucha indecisión y un cambio de rumbo, no podría estar más feliz del lugar donde estoy hoy.

Muchas gracias a Ceci y a Leti; son unas tutoras maravillosas que me guiaron y acompañaron en este proceso, siempre enseñándome con toda la paciencia y la mejor disposición. Y gracias a Rafa, mi compañero de mesada, siempre dispuesto a dar una mano o tirar un chiste para alegrar el día ¡Gracias pLL team!

Gracias a todos los del laboratorio de inmunología, por darme la bienvenida. Y gracias a la "casita del medio", que desde el día uno me hizo sentir acogida como una más del grupo.

Y por supuesto, gracias a toda mi familia, y, especialmente, a mis padres, a mis abuelos, a Lu, a Joaco y a Nala, por siempre estar ahí para apoyarme. Gracias por motivarme y empujarme hacia adelante para que lograra alcanzar mis metas.

Gracias Enzo, por estar a mi lado, siempre dispuesto a escucharme y aconsejarme. Gracias por todos los momentos que compartimos juntos.

Gracias a mis amigos, que me bancaron desde que éramos "lechuguitas", yendo al preescolar con nuestras túnicas verdes. Que estuvieron conmigo en el último día de escuela, en el último día del liceo, y ahora, en el último día de esta licenciatura. Me acompañaron en muchas etapas de la vida, y espero que me acompañen en muchas más.

¡Muchas gracias a todos!

RESUMEN

Los parásitos helmintos han co-evolucionado con el sistema inmune de los organismos a los que infectan, desarrollando así diversos mecanismos de evasión que favorecen su supervivencia. *Echinococcus granulosus* es el cestodo parásito causante de la equinococosis quística (hidatidosis), una enfermedad que afecta a diversos mamíferos, entre ellos a los humanos. El estado larvario (hidátide) de *E.granulosus* crece en la parénquima de los órganos del hospedero, protegido por una gruesa capa acelular denominada capa laminar (CL). Con el crecimiento de la hidátide, partículas de la CL son liberadas hacia al medio extracelular donde entran en contacto con células inmunes del hospedero, por lo que es posible que la CL cumpla un rol fundamental en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune ejercidos por el parásito.

En trabajos previos del grupo se ha puesto a punto un modelo de inyecciones repetidas de partículas de la CL (wpLL), observándose que replica fielmente los efectos de carácter inmunosupresor generados durante la infección experimental. Proyectos anteriores se han enfocado en la caracterización de los macrófagos, una población celular clave en el inicio y la regulación de la respuesta inmune. Ante la interacción con el material parasitario, los macrófagos se diferencian hacia un fenotipo de activación alternativa M2-*like* con un sesgo inmunosupresor evidenciado por la expresión de los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2.

Este trabajo busca caracterizar la población de células dendríticas (DC) locales en el modelo de inyecciones repetidas de wpLL. Las DC se destacan por su rol fundamental en la conexión entre la respuesta innata y la adaptativa, siendo las células presentadoras de antígenos que inician y regulan esta última respuesta.

Los resultados del presente trabajo evidenciaron que las diferentes subpoblaciones de DC locales tienen la capacidad de internalizar wpLL y activarse, aumentando su expresión de CD80 y CD86. Esta activación se ve polarizada hacia un fenotipo de activación alternativa (CD206, Relm- α e Ym1) con presencia de elementos inmunosupresores PD-L1 y PD-L2, de manera similar a lo observado en las poblaciones de macrófagos. Esto sugiere que las DC podrían participar en la inducción y/o mantenimiento del ambiente inmunosuprimido establecido por el parásito, destacando la posible relevancia de las señales de PD-L1 y PD-L2 en este fenómeno. Con respecto a la respuesta adaptativa inducida, se produce una respuesta Th2 (con secreción de citoquinas IL-5, IL-13 e IL-10), con presencia de anticuerpos IgE, IgG (IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3) e IgM específicos contra la CL.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BCR: receptor de células B (del inglés, B Cell Receptor)
- BSA: seroalbúmina bovina (del inglés, *Bovine Serum Albumin*)
- CCR: receptor de quimioquina (del inglés, Chemokine Receptor)
- CD: grupo de diferenciación (del inglés, *Cluster of Differentiation*)
- CDP: progenitor común de células dendríticas (del inglés, Common Dendritic cells Progenitor)
- cDC: células dendríticas convencionales (del inglés, conventional Dendritic Cells)
- cDC1: células dendríticas convencionales tipo 1
- cDC2: células dendríticas convencionales tipo 2
- CL: capa laminar
- CG: capa germinativa
- cMoP: progenitor común de monocitos (del inglés, common Monocyte Progenitor)
- DAMP: patrón molecular asociado a daño (del inglés, Damage Associated Molecular Pattern)
- DC: células dendríticas (del inglés, *Dendritic Cells*)
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- ELISA: enzimoinmunoanálisis de adsorción (del inglés, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay")
- FMO: fluorescencia menos uno (del inglés, "Fluorescence Minus One")
- HRP: peroxidas de rábano (del inglés, "HorseRadish Peroxidase")
- Ig: inmunoglobulina
- IL : interleuquina
- ILC: célula linfoide innata (del inglés, Innate Lymphoid Cell)
- InsP6: myo-inositolhexakifosfato
- ip : intraperitoneal
- MDP: progenitor de células dendríticas y macrófagos (del inglés, Macrophage and Dendritic cells Progenitor)
- MDSC: célula supresora de origen mieloide (del inglés, Myeloid-Derived Suppressor Cells)
- MHC: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, Major Histocompatibility Complex)
- moDC: células dendríticas derivadas de monocitos (del inglés, monocyte-derived Dendritic Cells)

- NK: célula asesina natural (del inglés, Natural Killer)
- PAMP: patrón molecular asociado a patógenos (del inglés, Pathogen Associated Molecular Pattern)
- PBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés, Phosphate Buffer Saline)
- PEC: células del exudado peritoneal (del inglés, Peritoneal Exudate Cells)
- PRR: receptor de reconocimiento de patrones (del inglés, Pattern Recognition Receptor)
- RPMI: medio del Instituto Roswell Park (del inglés, Roswell Park Memorial Institute medium)
- SFB: Suero Fetal Bovino
- s.l. : sensu lato (del latín, en sentido amplio)
- s.s.: sensu stricto (del latín, en sentido estricto)
- swLL: material soluble de la capa laminar íntegra (del inglés, soluble whole of Laminated Layer)
- TCR: receptor de célula T (del inglés, T Cell Receptor)
- Th : célula T colaboradora (*T-helper*)
- TMB: TetraMetilBencidina
- wpLL: suspensión de partículas de la capa laminar íntegra (del inglés, whole particles of the Laminated Layer)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Parásitos helmintos	9
1.2 Echinococcus granulosus	9
Ciclo de vida del Echinococcus granulosus s.l.	10
Figura 1. Esquema del ciclo de vida del Echinococcus granulosus s.l.	11
Estructura de la hidátide	12
Figura 2. Diagrama representativo de los metacestodos de E. granulosus.	13
1.3. Generalidades sobre el funcionamiento del sistema inmune	13
1.4. Células dendríticas	15
Figura 3. Modelo del desarrollo de las células dendríticas.	17
Células dendríticas convencionales : cDC1 y cDC2	17
Figura 4. Funciones de las cDC1 y cDC2.	19
Células dendríticas derivadas de monocitos: moDC	19
1.5 Inmunología de los parásitos helmintos	20
Respuesta inmune frente a la infección por E. granulosus - antecedentes del grupo	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo general	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Preparación de los materiales parasitarios	24
Obtención y procesamiento de las hidátides	24
Preparación de una suspensión de partículas íntegras de CL (wpLL, del inglés whole par	rticles
of Laminated Layer)	25
Preparación de material soluble de CL (swLL)	25
3.2 Experimentos in vivo	26
Administración in vivo de wpLL	26

Figura 5. Representación gráfica del esquema de inyecciones y posterior toma de	5
muestras.	27
3.3 Extracción de muestras biológicas	27
Lavado peritoneal	27
Extracción de sangre y obtención de sueros	27
Procesamiento de bazo y nodos mesentéricos	27
3.4. Procesamiento y análisis de las muestras obtenidas	28
Citometría de flujo	28
Tabla 1. Listado de los anticuerpos y reactivos utilizados en el análisis por citome	tría
de flujo.	29
Estrategia de gating para análisis de citometría de flujo	30
Figura 6. Ejemplo de estrategia de definición de las subpoblaciones de células	
dendríticas	31
3.5 Cuantificación de la respuesta serológica	31
Detección de Inmunoglobulinas G y M	31
Figura 7. Esquema de ELISA indirecto utilizado para la detección de IgM e IgG tot	ales,
y las subclases, IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3	32
Detección de Inmunoglobulina E utilizado para la detección de IgE	32
Figura 8. Esquema de ELISA de captura.	33
Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados para la detección de inmunoglobulinas	por
ELISA.	33
Re-estimulación in vitro de células de bazo y nodo linfático mesentérico	34
Cuantificación de citoquinas en solución mediante ELISA	34
Tabla 3. Diluciones utilizadas para los ELISAS de determinación de citoquinas y	
soluciones tampón utilizadas .	35
3.6 Análisis estadístico	36
3. RESULTADOS	37
3.1 Caracterización de células dendríticas en la cavidad peritoneal	37
Análisis de la población global de células dendríticas	37

Figura 9. La población de DC aumenta en tamaño, pero no en porcentaje, tras las

ir	nyecciones repetidas de wpLL	38
F	igura 10. Las inyecciones repetidas de wpLL en la cavidad peritoneal aumentan el	
р	oorcentaje de DC que expresan los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2, y los marcadores	de
a	ectivación alternativa Relm- $lpha$, CD206 y Ym1	41
F	igura 11. Las inyecciones de wpLL causan un aumento en el nivel de expresión de	
lc	os marcadores de activación CD80 y CD86, de la molécula co-inhibidora PD-L2, y d	e
lc	os marcadores de activación alternativa Relm- $lpha$ y Ym1 en las DC	43
Análisis d	le las subpoblaciones de células dendríticas	43
F	igura 12. Estrategia para la definición de las subpoblaciones de DC presentes en la	
C	avidad peritoneal.	45
F	igura 13. Las inyecciones repetidas de wpLL en la cavidad peritoneal afectan las	
р	proporciones y número de las diferentes subpoblaciones de DC locales	46
Expre	esión de marcadores moleculares en las subpoblaciones de células dendríticas	46
F	igura 14. Las inyecciones repetidas de wpLL en la cavidad peritoneal afectan, en	
r	nayor o menor medida, las proporciones de las subpoblaciones de DC que expresa	n
lc	os diferentes marcadores de activación	49
F	igura 15. Las inyecciones repetidas de wpLL en la cavidad peritoneal afectan, en	
r	nayor o menor medida, la expresión de los diferentes marcadores de activación er	۱
la	as distintas subpoblaciones de DC.	51
F	igura 16. Las moDC representan las DC con mayor internalización de wpLL en la	
C	avidad peritoneal.	51
3.2 Efectos er	n la respuesta de la inmunidad adaptativa	52
Respuesta	a de los linfocitos T en el bazo y los nodos linfáticos	52
F	igura 17. Las inyecciones repetidas de wpLL inducen en bazo una respuesta T	
р	polarizada a Th2	53
Respuesta	a de los linfocitos B: Anticuerpos	53
Cuant	tificación de anticuerpos específicos contra wpLL: IgG, IgG2b, IgG2c, IgG3 e IgM	53
F	igura 18. Las inyecciones repetidas de wpLL inducen la producción de anticuerpos	
e	específicos contra elementos de la CL.	55
Cuantifica	ación de IgE total	55

	Figura 19. Las inyecciones repetidas de wpLL inducen un aumento en la producció	n
	de IgE.	56
4. DISCUSIÓN		56
5. CONCLUSION	NES	61
	Figura 20. Representación del modelo de funcionamiento de las DC propuesto.	
6. BIBLIOGRAF	ÍA	63

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Parásitos helmintos

Los helmintos son organismos multicelulares pertenecientes al reino de los metazoos. Dentro de este grupo se distinguen dos taxa: los nematodos y los platelmintos. Dentro de ambas existen ejemplares que son capaces de actuar como agentes patógenos (parásitos) presentando un amplio espectro en cuanto a mecanismos de infección y el nicho que ocupan en el organismo de su hospedero, invadiendo desde el lumen intestinal a nichos intravasculares o incluso intracelulares. A pesar de esta gran diversidad, la respuesta de los hospederos mamíferos a la infección por estos patógenos es consistente y estereotípica en la gran mayoría de los casos ¹, como se profundizará más adelante. La infección por parásitos helmintos (helmintiasis) afecta a millones de personas a nivel mundial. Estas enfermedades suelen presentarse como asintomáticas o con una sintomatología leve, aunque en algunos casos se desarrollan síntomas más agravados, tales como anemia, dolor abdominal y desnutrición ².

Los parásitos helmintos han co-evolucionado junto a sus hospederos, desarrollando mecanismos de manipulación del sistema inmune que les permite mejorar su sobrevida. En paralelo, los organismos hospederos han desarrollado respuestas que permiten en algunos casos eliminar el parásito, o al menos reducir la patología que causan, para que los efectos adversos de la infección sean menores. La suma de ambos fenómenos resulta en la generación de infecciones crónicas y asintomáticas, que pueden pasar desapercibidas por largos períodos de tiempo ³.

1.2 Echinococcus granulosus

El término *Echinococcus* refiere a un género de parásitos del filo platelmintos y de la clase cestoda pertenecientes a la familia *taeniidae*. Dentro de este género se identifican actualmente diez especies: cinco derivadas del grupo parafilético conocido como *E. granulosus sensu lato* (*E. granulosus sensu stricto, E. borealis, E. intermedius, E. equinus, E. ortleppi*), y cinco por fuera de este grupo (*E. shiquicus, E. felidis, E. multilocularis, E. vogeli*, y *E. oligarthra*). Dentro de la especie más estudiada, *E. shiquicus, E. felidis, E. multilocularis, E. vogeli*, y *E. oligarthra*).

granulosus sensu stricto (s.s.), es posible identificar tres genotipos: G1, G2 y G3. Aunque poseen diferencias en sus ciclos de transmisión, todos son infecciosos para los humanos ^{4–7}.

La echinococcosis quística es la infección zoonótica causada por las especies del grupo *E. granulosus s. l.*. Esta enfermedad, altamente endémica, es de particular relevancia en países de Asia, África y América del Sur, afectando entre 1 y 200 personas por cada 100.000 habitantes. (Wang et al., 2014; Wen et al., 2019). En zonas hiperendémicas, se ha observado que entre un 20% y 95% de animales de ganado sacrificados presentan echinococcosis ¹⁰.

Ciclo de vida del Echinococcus granulosus s.l.

El ciclo de vida de *E. granulosus s.l.* se esquematiza en la *Figura 1*. Los gusanos adultos viven en el intestino delgado de sus hospederos definitivos (cánidos, particularmente perros), alcanzando tamaños de entre 3 y 7 mm de largo. Allí liberan sus huevos, los cuales son excretados al ambiente a través de las heces. Al ser ingeridos por su hospedero intermediario, sea animales de pastoreo o humanos accidentalmente, los huevos eclosionan liberando la oncosfera (embrión larvario), la que es capaz de penetrar la mucosas intestinal y migrar a través del torrente sanguíneo o los vasos linfáticos hasta los órganos internos, en donde desarrolla su etapa de metacestodo (estadio larvario, también denominado hidátide). En su interior, las hidátides producen hasta miles de protoescólices (por medio de reproducción asexual), cada uno con la capacidad de infectar nuevamente a un hospedero definitivo y madurar al estadio adulto en el intestino delgado para comenzar nuevamente el ciclo. Además, los protoescólices tienen la capacidad de generar nuevas hidátides en el hospedero intermediario, lo que podría suceder por la ruptura de una hidátide y consecuente liberación de los protoescólices al espacio intersticial (este tipo de re-infección se conoce como infección secundaria)^{6,8,9}.



Figura 1. Esquema del ciclo de vida del Echinococcus granulosus s.l.. El parásito adulto madura en el intestino delgado del hospedero definitivo y libera sus huevos. Estos son excretados a través de las heces, pudiendo ser luego ingeridos por el hospedero intermediario. En el intestino delgado del hospedero intermediario los huevos eclosionan y liberan la oncosfera, la cual es capaz de migrar hacia los órganos internos para desarrollarse a su etapa de metacestodo larval (hidátide), dentro de la cual se dará la producción de miles de protoescólices a través de reproducción asexual. Los protoescólices son capaces de infectar al hospedero definitivo, (iniciando nuevamente el ciclo) o de generar nuevas hidátides en el hospedero intermediario (infección secundaria). Adaptada de ⁶.

Estructura de la hidátide

Los hospederos intermediarios, usualmente animales de pastoreo (ó accidentalmente humanos) desarrollan hidátides tras la infección por *E. granulosus*. Las mismas se ubican en los órganos internos (principalmente en hígado y pulmones) y son capaces de crecer entre 1 a 5 cm por año, alcanzando tamaños de hasta decenas de centímetros. A pesar del gran tamaño y relevancia de los órganos que afectan, las hidátides son capaces de residir en el hospedero sin provocar una respuesta inmune acorde, por lo que quienes las padecen pueden vivir por años desconociendo su presencia. Las manifestaciones clínicas desarrolladas a raíz de la equinococosis quística son causadas por el tamaño del quiste y las complicaciones mecánicas que este implica, o por una reacción de hipersensibilidad aguda causada tras la ruptura de la hidátide ^{11,12}.

Las hidátides (*Figura 2*) se desarrollan en el parénquima de los órganos internos del hospedero, y constituyen estructuras sub-esféricas, llenas de líquido y delimitadas por una pared compuesta por dos capas. La capa interna (llamada capa germinativa, CG) está formada por tejido vivo y es responsable de sintetizar y mantener todas las estructuras de la hidátide. Esta capa es la productora de los protoescólices, el estadio capaz de infectar al hospedero definitivo, que se generan por reproducción asexual y se mantienen en el interior de la hidátide dentro de vésiculas prolígeras. La capa más externa (denominada capa laminar, CL), también es producida por la CG, y separa físicamente a la CG de las células y matriz extracelular del hospedero. La CL es gruesa (hasta 3 mm de espesor), acelular, y compuesta mayoritariamente por mucinas con motivos glucídicos ricos en galactosa, acompañadas por depósitos de calcio del *myo*-inositolhexakifosfato (InsP6.Ca). A nivel de microscopía electrónica, se observa que las mucinas forman una red de fibrillas, con los gránulos de InsP6.Ca distribuidos de manera individual o en aglomeraciones. Cabe destacar que el InsP6 es una molécula ubicua en células eucariotas, normalmente presente en el citosol y núcleo, por lo que su presencia en un contexto extracelular es bastante llamativa y única de *E. granulosus* ^{13–15}.

A medida que la hidátide crece, la CL comienza a descamarse, liberando partículas al medio extracelular, por lo que se cree que esta capa debe ser la principal fuente de moléculas de *E. granulosus* con las que se encuentra el sistema inmune del hospedero ^{14,15}.



Figura 2. Diagrama representativo de las hidátides de E. granulosus. La larva de E. granulosus es una estructura sub-esférica, llena de líquido, que crece en los órganos internos del hospedero. Está rodeada por una pared conformada por dos capas; una capa interna (capa germinativa), y una capa externa (capa laminar). La pared suele estar rodeada por una capa de colágeno proveniente del hospedero. Tomada de ¹⁴.

1.3 Generalidades sobre el funcionamiento del sistema inmune

El sistema inmune se encarga de proteger al organismo de la enfermedad, ya sea causada por la infección por agentes patógenos (como virus, bacterias o parásitos), o por desbalances en el propio organismo. La primera línea de defensa consiste de barreras físicas (como la piel o los epitelios mucosos), químicas (por ejemplo, a través de enzimas antimicrobianas como la lisozima y la fosfolipasa A2) y microbiológicas (microbiota normal). Cuando un organismo patógeno vence dichas barreras, las células inmunes innatas que residen en el tejido afectado (sean macrófagos, células dendríticas o mastocitos) son capaces de detectar señales de peligro asociadas al mismo (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) o al daño que causa en las células propias (DAMPs, *damage associated molecular patterns*), a través de un conjunto de receptores conocidos como PRRs (*pattern recognition receptors*). Este reconocimiento activa los mecanismos de defensa de dichas células, causando, entre otros, la internalización del patógeno o de las células afectadas y su eventual degradación ¹⁶. A su vez, se activa la síntesis de citoquinas y quimioquinas desencadenantes del proceso inflamatorio. La inflamación tiene dos funciones principales: suministrar moléculas y células

efectoras al sitio de infección, que contribuyen a limitar la propagación del patógeno, y facilitar la activación de las células del sistema adaptativo. Para esto, ocurre un proceso de vasodilatación que aumenta el volumen de los capilares sanguíneos y disminuye la velocidad de flujo de la sangre que circula por la zona. Este fenómeno es acompañado por un incremento de la permeabilidad vascular y la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales que revisten el capilar sanguíneo, para promover la unión de células sanguíneas específicas y su extravasación al tejido infectado. Las células reclutadas varían en función de los PRRs implicados en el reconocimiento del patógeno y el perfil de citoquinas que producen las células innatas. En infecciones por parásitos helmintos se reclutan particularmente eosinófilos y basófilos, aunque también monocitos y neutrófilos, que contribuirán en mayor o menor medida a controlar la infección ^{16,17}.

A continuación ocurre la inducción de la inmunidad adaptativa. Las células dendríticas (DC) inmaduras presentes en el tejido se distinguen por su gran actividad macropinocítica y fagocítica, y por su capacidad de procesar antígenos. Los patógenos extracelulares (o sus componentes) son internalizados y procesados para la posterior presentación de péptidos provenientes del antígeno cargados en moléculas de MHCII (complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II). Si esto ocurre en presencia de un proceso inflamatorio las DC maduran y se activan, aumentando la expresión de las moléculas de MHC y moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86), así como de CCR7. El aumento de la expresión de CCR7, sumado al proceso inflamatorio, determina la migración de las DC hacia los nodos linfáticos drenantes del tejido. Una vez allí, las DC presentan el complejo péptido-MHCII a linfocitos T CD4+ vírgenes para su activación. Esta activación requiere de 3 señales; 1- la interacción específica entre el complejo MHCII-péptido y el receptor de los linfocitos T (TCR), 2- la interacción entre las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 de la DC y CD28 de los linfocitos T, y 3- la señal transmitida a través de las citoquinas liberadas por la DC. Los linfocitos entonces son activados, proliferan y se diferencian hacia diferentes linajes de linfocitos T colaboradores efectores (linfocito Th, por *T helper lymphocyte*), y linfocitos T de memoria ¹⁶.

Dentro de los linajes de linfocitos Th efectores se encuentran los linfocitos Th1, Th2 y Th17 que migran al sitio de infección a colaborar con las células en la periferia, y los linfocitos Th foliculares (Thf), que participan en la activación de los linfocitos B en el órgano linfoide secundario. Los linfocitos Th1 se especializan en el control de infecciones por patógenos intracelulares (bacterias, virus, protozoarios), y participan también en la respuesta antitumoral. Estas células se caracterizan por la producción de IFN- γ y TNF- α como citoquinas principales, y generan un aumento en la activación

microbicida de los macrófagos (conocida como activación clásica o fenotipo M1). Los linfocitos Th2 producen las citoquinas IL-4, IL-5, e IL-13. Este tipo de respuesta se induce en respuesta a las infecciones por helmintos; contribuye al reclutamiento de eosinófilos y a la activación de macrófagos con funciones reparadoras de tejido (conocida como activación alternativa o fenotipo M2). La respuesta Th17 se caracteriza por la producción de la citoquina IL-17, y está asociada a la amplificación de la inflamación aguda en sitios de infección temprana, colaborando con la función de los neutrófilos, sobre todo en la respuesta contra bacterias extracelulares ^{16,18}. Por su parte, las células Thf colaboran con la activación de los linfocitos B y participan en la generación del centro germinal, donde guían (mediante la producción de citoquinas) el cambio de clase de las inmunoglobulinas. Además, contribuyen en el proceso de maduración de la afinidad que lleva a la generación de células plasmáticas y linfocitos B de memoria más eficientes ¹⁹.

Por otro lado, los linfocitos B vírgenes interaccionan con el antígeno (que llega a los nodos linfáticos gracias a la inflamación) a través de su receptor BCR, lo internalizan y procesan para presentarlo como péptidos cargados en moléculas de MHCII. Luego, los linfocitos B migran dentro del nodo linfático hacia la región donde se encuentran los linfocitos Thf previamente activados, y allí les presentan el antígeno. El linfocito B se activa en respuesta a dos señales 1- la interacción entre el BCR y el antígeno específico, y 2- la interacción CD40-CD40L que ocurre tras la interacción específica MHCII-péptido:TCR con los linfocitos Thf. Así se da inicio a dos procesos. En primer lugar, los linfocitos B proliferan y se diferencian en plasmablastos, células de vida media corta capaces de secretar anticuerpos IgM e IgG de baja afinidad. En segundo lugar, los linfocitos B forman el centro germinal en donde proliferan y ocurre la hipermutación somática y el cambio de clase de las inmunoglobulinas. Luego, maduran su afinidad en un proceso mediado por células dendríticas estromales (conocidas como células dendríticas foliculares), en el que vuelven a intervenir los linfocitos Thf. Los linfocitos B de mejor afinidad proliferan y se diferencian hacia plasmocitos (células productoras de anticuerpos de vida media larga) o linfocitos B de memoria ^{16,18}.

1.4 Células dendríticas

Las células dendríticas son un grupo heterogéneo de fagocitos mononucleares con una gran versatilidad de funciones. Son reconocidas por su papel como las células presentadoras de antígenos más eficientes del sistema inmune y cumplen un rol fundamental en la conexión entre la respuesta innata y la adaptativa, siendo capaces de modular la inmunidad hacia diferentes tipos de respuestas activas o hacia la inducción de tolerancia, dependiendo del contexto inflamatorio. Su distribución en la mayoría de los tejidos les aporta una ubicación estratégica para la detección de patógenos por todos los posibles sitios de entrada. A través del rápido reconocimiento de patógenos y la consecuente producción de citoquinas, son capaces de activar otras células en el tejido, como macrófagos y células linfoides innatas (ILC) para contribuir a limitar la expansión de la infección previo al inicio de la respuesta adaptativa²⁰.

Las células dendríticas tienen una vida media corta, por lo que están en constante reposición por progenitores derivados de la médula ósea. Existen dos vías posibles de desarrollo de células dendríticas. En la médula ósea (*Figura 3*), las células madre pluripotenciales dan origen a un progenitor bipotencial (MDP, por *macrophage and dendritic cells progenitor*) capaz de diferenciarse al progenitor común de monocitos (cMoP, por *common monocyte progenitor*) o al progenitor común de células dendríticas (CDP, por *common dendritic cell progenitor*). A su vez, los CDPs pueden diferenciarse hacia células dendríticas plasmocitoides (cuyo rol se enfoca en la respuesta contra infecciones virales) o a pre-DCs. Las pre-DCs migran a través de la sangre hacia los tejidos, donde se diferencian a dos subtipos de células dendríticas convencionales (cDC, por *conventional dendritic cells*): cDC1 y cDC2, en respuesta a señales microambientales específicas del tejido. Esta vía de desarrollo se considera como el modelo convencional de diferenciación a DC. Por su parte, los monocitos que surgen de los cMoPs completan su desarrollo en la médula ósea y luego migran hacia los tejidos a través del torrente sanguíneo. Al alcanzar el tejido, se diferencian a macrófagos o células dendríticas, dando lugar a una segunda vía de desarrollo de DC. Estas células se denominan células dendríticas derivadas de monocitos (moDC, por *monocyte derived dendritic cell*)²¹.



Figura 3. Modelo del desarrollo de las células dendríticas. MDP es el progenitor derivado de células madres pluripotentes en la médula ósea, con la capacidad de diferenciarse hacia CDPs o cMoPs. Los CDPs se pueden diferenciar hacia células dendríticas plasmáticas o pre-DCs. Las pre-DC circulan en la sangre y se diferencian en distintos subtipos de DC convencionales en el tejido. Los cMoPs dan lugar a los monocitos que circulan en la sangre y son capaces de diferenciarse hacia macrófagos o células dendríticas en el tejido. Adaptado de ²¹.

Células dendríticas convencionales : cDC1 y cDC2

Como se mencionó previamente, las células dendríticas son un grupo extremadamente diverso y con una gran plasticidad funcional. Cada célula es capaz de adaptarse al contexto, y responder de maneras muy diversas para encaminar a la inmunidad hacia una respuesta específica en cada situación. Más allá de la maleabilidad individual, es posible identificar subpoblaciones de DC que presentan cierto grado de especialización hacia distintos perfiles de respuesta. La primera subdivisión se basa en las diferencias respecto a su orígen, dividiéndose en convencionales (cDC) o derivadas de monocitos (moDC). Dentro de las cDC se distinguen dos subpoblaciones principales, las cDC1 y las cDC2. Ambas se hallan en la mayoría de tejidos, tanto linfoides como no linfoides. Las poblaciones residentes de tejidos linfoides (cDC residentes) pasan toda su vida dentro de los órganos linfoides secundarios, y participan en la inducción de la respuesta adaptativa presentando antígenos que llegan a los mismos a través del drenaje de líquido linfático. Aquellas DC residentes de los tejidos periféricos son capaces de migrar hacia los nodos linfáticos (por lo que se denominan cDC migratorias) de manera dependiente de CCR7, donde presentan antígenos provenientes de los tejidos periféricos, y aportan información sobre el contexto en el cual se encontró al antígeno (principalmente a través de la secreción de citoquinas). En el nodo linfático ambos tipos de cDC colaboran entre sí para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa ^{22,23}.

Existen algunas diferencias funcionales entre las cDC1 y las cDC2, las cuales podrían atribuirse a divergencias en cuanto a la expresión de PRRs y la ubicación de cada subpoblación una vez en el nodo linfático. A través de estudios de expresión genética y proteómica, se ha establecido que hay diferencias en los PRRs expresados por cada subtipo de cDC, posiblemente impactando las contribuciones de cada uno en la respuesta inmune. En cuanto a su ubicación, las cDC1 se localizan predominantemente en la zona T de los nodos linfáticos, mientras que las cDC2 se localizan hacia el córtex (si son residentes) o en la zona interfolicular, cerca del borde entre células B y T del nodo (si son migratorias). Esta distribución se asemeja a la forma en la que se ubican los linfocitos T CD8+ y los CD4+ en el nodo, lo cual explicaría por qué se ha observado que cada subpoblación de cDC posee cierto nivel de preferencia para presentar el antígeno a las distintas poblaciones de linfocitos T ^{22,24}.

Es importante destacar que, a pesar de que cada subtipo de cDCs presenta cierta especialización hacia determinados perfiles de respuesta, todas las cDC son altamente plásticas y con una gran capacidad de adaptación, por lo que ninguna está limitada a una única función y suele ser el trabajo en conjunto de todas las subpoblaciones el que dirige la respuesta inmune ²⁴. De todas formas, conocer las funciones estereotipadas de cada una de ellas puede ayudar a comprender mejor su rol general en la respuesta.

Las cDC1 (*Figura 4*), además de presentar antígenos a linfocitos T CD4+ (MHCII-péptido), se especializan en la presentación cruzada de antígenos en moléculas de MHCI a linfocitos T CD8+. Su función principal se asocia al desencadenamiento de una respuesta de tipo 1, iniciando la activación temprana de ILC1s, NK y más tarde, durante la inducción de la respuesta adaptativa, la activación de linfocitos T CD4+ y su diferenciación a células efectoras Th1 (asociado a la gran capacidad de las cDC1 de producir IL-12). De esta forma, este tipo celular es particularmente relevante en la respuesta contra bacterias intracelulares, virus y células tumorales ^{20,24–27}.

Las cDC2 (*Figura 4*) mayoritariamente presentan antígenos en complejo con MHCII a linfocitos T CD4+. Esta población está asociada a la inducción de una respuesta de tipo 2 contra parásitos multicelulares. También son capaces de activar ILC3 e iniciar una respuesta Th17^{20,25}.



Figura 4. Funciones de las cDC1 y cDC2. Las cDC1 se asocian a la inducción de respuestas Th1 y a la activación de linfocitos T CD8+. Por otra parte, las cDC2 realizan la presentación de antígenos preferentemente a linfocitos T CD4+, y participan en la inducción de respuestas Th2 y Th17. Adaptada de ²⁰.

Células dendríticas derivadas de monocitos: moDC

Los monocitos son leucocitos circulantes con la capacidad de migrar a los tejidos y diferenciarse en macrófagos o células dendríticas. En condiciones de homeostasis, contribuyen con la renovación de la población de macrófagos residentes de los tejidos. Durante la infección, la migración aumenta debido al reclutamiento causado por la inflamación local y comienzan a diferenciarse a DC (además de a macrófagos). Las moDC son una población altamente heterogénea y como consecuencia presentan una amplia gama de funciones, participando tanto en procesos pro-inflamatorios como

anti-inflamatorios. Se ha observado que las moDC poseen una capacidad de presentación de antígenos tan buena como la de las cDC, pero migran en menor medida hacia los nodos linfáticos, y como consecuencia no participan en forma relevante en la activación de las células T vírgenes ²⁵. Por tanto, las moDc serían capaces de actuar como células presentadoras de antígenos en los tejidos para la reactivación de células T efectoras o T memoria efectoras que ya tuvieron contacto con el antígeno ^{25,28}.

1.5 Inmunología de los parásitos helmintos

Como se mencionó anteriormente, los parásitos helmintos son un grupo complejo de metazoos de diferentes familias taxonómicas. A pesar de su gran diversidad, los helmintos como grupo inducen un mismo sesgo de respuesta inmune, polarizada a Th2, y han demostrado tener una gran capacidad de regular negativamente la respuesta inmune del hospedero.

La respuesta Th2 se caracteriza por la proliferación y activación de células T secretoras de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 ^{1,29,30}. La IL-4 y la IL-13 son citoquinas estructural y funcionalmente relacionadas, e inducen la polarización de macrófagos hacia un fenotipo alternativamente activado o M2, asociado a la reparación de tejidos ^{31,32}. Por su parte, la IL-5 se asocia a un aumento en la producción de eosinófilos y su reclutamiento al tejido infectado. La IL-9 promueve el cambio de clase de anticuerpos hacia IgG1 (IgG4 en humanos) e IgE, y participa en la potenciación de la actividad de los mastocitos ¹⁶. La efectividad de una respuesta Th2 no siempre es evidente, sin embargo, sí es efectiva en algunas infecciones por parásitos gastrointestinales, en las cuales las citoquinas producidas por los linfocitos Th2 contribuyen a la activación del músculo liso, el aumento de la motilidad intestinal, el recambio de células epiteliales, y el aumento del número de células caliciformes (con la consecuente hipersecreción de mucus), para así promover la inmovilización de los parásitos y su eliminación ¹⁸.

A pesar de que el sistema inmune del hospedero responde con el despliegue de una respuesta de tipo 2, durante la infección los parásitos helmintos son capaces de adaptarse a la misma e inducir elementos de regulación negativa. Esto da pie a una respuesta conocida como "tipo 2 modificada", caracterizada generalmente por una secreción disminuída de IL-5 e IL-13, un aumento en la secreción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β , la expansión de poblaciones de células T reguladoras (Treg) ^{30,33}, el reclutamiento de MDSC (por *myeloid-derived suppressor cells*), o la inducción de macrófagos con fenotipos supresores ^{34–36}.

Respuesta inmune frente a la infección por E. granulosus - antecedentes del grupo

Nuestro grupo de trabajo estudia la interacción de la hidátide de *E. granulosus* con su hospedero como un ejemplo extremo de capacidad de evasión de la respuesta inmune por un patógeno, ya que éste parásito no induce una respuesta acorde a su tamaño y persistencia, estableciendo infecciones generalmente asintomáticas y de muy larga duración.

En trabajos previos realizados por el grupo de investigación se estudiaron los efectos de la infección experimental por E. granulosus s.s. sobre diferentes componentes del sistema inmune local y particularmente sobre los macrófagos. Para esto se utilizó un modelo de infección secundaria que consiste en la inyección intraperitoneal de ratones con protoescólices viables, con el consecuente desarrollo de hidátides en la cavidad peritoneal. Se observó un aumento en la celularidad general a nivel local, causada principalmente por el crecimiento de las poblaciones de eosinófilos, células T, monocitos y macrófagos. También se verificó la inducción de un ambiente inmunosuprimido, con presencia de distintas poblaciones de monocitos/macrófagos con fenotipo tipo M2 (M2-like) con sesgo supresor. Este fenotipo M2-like fue definido por la expresión de los marcadores Relm-α y Ym-1, y por un aumento en los niveles de expresión de los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2 (la expresión de estas dos últimas moléculas es la que atribuye características inmunosupresoras a las células). Además, en el medio local donde se desarrollan las hidátides, se observaron altos niveles de actividad de la enzima arginasa-1 (marcador fenotípico de macrófagos M2) y las citoquinas anti-inflamatorias TGF- (que inhibe la respuesta de los linfocitos T³⁷) e IL-1Ra (que compite con IL-1 β e inhibe sus efectos proinflamatorios⁴⁶). En cuanto a las poblaciones de linfocitos T, se identificó una expansión de las células Treg (FoxP3+) y de células T efectoras PD-1+, las cuales representan un posible blanco para la supresión por parte de los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2, previamente mencionados. Esto último resulta congruente con ensayos in vitro que mostraron que los linfocitos T efectores locales provenientes de ratones infectados tienen diezmada la capacidad de proliferar en respuesta a un estímulo policional como el anticuerpo anti-CD3³⁴.

Por otro lado, el grupo de investigación ha trabajado largo tiempo en el estudio de la CL de *E. granulosus*, tanto en relación a su composición como a sus eventuales funciones inhibidoras de la respuesta inmune ^{4,13,14,33,34,38,39}. El interés en la capacidad inmunosupresora de esta estructura radica en dos observaciones: primero, la CL comprende la mayor fuente de material del parásito expuesto

hacia el hospedero (siendo capaz de interaccionar con los leucocitos y unir diversidad de moléculas solubles del hospedero) ^{33,40,41} y, segundo, que su aparición durante el establecimiento y el desarrollo de la hidátide coincide en el tiempo con el fenómeno de fuerte control de la respuesta inflamatoria que caracteriza a la infección por este parásito ^{33,42,43}.

Como se mencionó previamente, para crecer la hidátide debe liberar partículas de las capas más superficiales de la CL hacia el intersticio, donde se exponen al contacto con células del sistema inmune ^{14,33,38} de manera continua a lo largo del tiempo de infección. Teniendo en cuenta esto, en los últimos años el grupo de investigación ha puesto a punto un modelo de inyecciones repetidas de partículas de la CL (wpLL, *whole particulated laminated layer*) para estudiar el efecto de un encuentro persistente en el tiempo de las células inmunes con la partículas, y así imitar la forma en la que el sistema inmune interactúa con las mismas durante la infección crónica. Se observó que este modelo reprodujo los resultados obtenidos en el modelo de infección, con un aumento de los eosinófilos, y de las poblaciones de monocitos/macrófagos que expresan los marcadores Relm- α , Ym-1, PD-L1 y PD-L2. También, la estimulación persistente con wpLL resultó en un aumento de la producción local de TGF- β e IL-1RA, y una expansión de las poblaciones de linfocitos Treg y de linfocitos T efectores PD-1+ (tesis de doctorado de Leticia Grezzi, en curso; resultados no publicados).

Estos resultados en conjunto señalan a la CL como un componente clave para el establecimiento de la inmunosupresión por el parásito. El presente trabajo busca profundizar en la caracterización del modelo de inyecciones repetidas de wpLL, estudiando la respuesta de las DC locales.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

A partir de la inyección intraperitoneal de una preparación de partículas derivadas de la CL (wpLL) de *E. granulosus s.s.*, nos planteamos estudiar los cambios inducidos en el fenotipo de las DC locales, células clave en la inducción y regulación de la respuesta adaptativa. A su vez, evaluaremos la respuesta de los linfocitos T en los órganos linfáticos secundarios, y la respuesta consecuente de los linfocitos B (mediante estudio de la clase de anticuerpos específicos circulantes).

2.2 Objetivos específicos

Utilizando el modelo de inyecciones repetidas de wpLL:

- 1. Evaluar los efectos sobre el fenotipo de la DC totales de la cavidad peritoneal.
- 2. Identificar las subpoblaciones de DC de la cavidad peritoneal y caracterizar diferencialmente el fenotipo inducido en las mismas.
- Estudiar los efectos sobre la respuesta adaptativa a nivel de respuesta de células T: evaluación del perfil de citoquinas producido por los linfocitos T de bazo y nodos linfáticos drenantes del tejido.
- 4. Estudiar los efectos sobre la respuesta adaptativa a nivel de respuesta de células B: cuantificación de los anticuerpos específicos producidos contra las partículas de la capa laminar: IgGs totales y sus diferentes subclases (IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3), IgM e IgE.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación de los materiales parasitarios

Obtención y procesamiento de las hidátides

Se obtuvieron hidátides procedentes de ganado bovino infectado naturalmente con *Echinococcus granulosus s.s.*. Los órganos infectados, principalmente pulmones, fueron cedidos gentilmente por plantas de procesamiento de vísceras de ganado bovino (Urexport) y procesados en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Higiene. Durante el procesamiento de las hidátides, se extrajeron las paredes que estuvieran en buen estado, de coloración blancuzca, o ligeramente amarillenta, seleccionando aquellas provenientes de hidátides fértiles (con presencia de protoescólices en el líquido hidático). Las paredes extraídas se lavaron dos veces con solución fisiológica (PBS, *Phosphate buffered saline*) y se conservaron a -20°C hasta su utilización. Los protoescólices pareados con las paredes utilizadas fueron genotipados por amplificación y secuenciación de citocromo c oxidasa mitocondrial de acuerdo al protocolo planteado en ⁴⁴. El genotipo de todas las muestras utilizadas fue G1.

Las paredes almacenadas se descongelaron y se sometieron a lavados rápidos con PBS CaCl₂ 0.1 mM, seguido de un lavado de 3 horas y otro de 24 horas con la misma solución tampón. Posteriormente, se realizaron dos lavados idénticos a los anteriores pero utilizando NaCl 2 M CaCl₂ 0.1 mM. El CaCl₂ se adiciona a todas las soluciones utilizadas con la finalidad de preservar la integridad de los depósitos de InsP6.Ca en el material ¹³. Por su parte, la alta fuerza iónica de la solución 2M de NaCl permite remover la mayoría de las proteínas provenientes del hospedero, adsorbidas a la CL en el transcurso la infección, aunque trabajos previos mostraron que una porción de los anticuerpos del hospedero permanece adsorbida ⁴⁵. Finalmente, se llevaron a cabo tres lavados rápidos con agua destilada para remover las sales. El material obtenido se congeló a -80°C en un volumen mínimo de agua y se liofilizó durante 24 horas. El liofilizado se molió primero en mortero y luego entre dos vidrios esmerilados (porfirización), hasta la obtención de un pulverizado fino. El producto final fue conservado a 4°C hasta su uso.

Preparación de una suspensión de partículas íntegras de CL (wpLL, del inglés whole particles of Laminated Layer)

Esta preparación se realizó en condiciones de esterilidad (cabina de flujo laminar) y utilizando soluciones preparadas con agua apirógena, para su posterior uso como material inyectable. El pulverizado fino de CL se rehidrató lentamente en PBS CaCl₂ 0.1 mM, disgregando mecánicamente los grumos generados utilizando un homogeneizador de tipo "Potter-Elvehjem" (previamente lavado 12 horas en NaOH 0.1 M para reducir los niveles de pirógenos, y luego autoclavado). Una vez obtenida la suspensión, se realizaron filtrados secuenciales a través de mallas de serigrafía con tamaños de corte de 85 µm, 45 µm y 23 µm. La suspensión de partículas que logró pasar por el filtro de 23 µm se lavó 10 veces con PBS CaCl₂ 0.1 mM a 3500 g por 5 minutos, con la finalidad de remover eventuales contaminantes pirógenos. Luego del último lavado, la fracción fue resuspendida en PBS CaCl₂ 0.1 mM conteniendo una mezcla de antibióticos (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina) y antimicótico (0,25 µg/ml anfotericina B). Este material fue denominado wpLL (del inglés *whole particles of Laminated Layer*) ³⁹. Para determinar la concentración de la suspensión, en términos de masa seca, se liofilizó una alícuota del material previamente lavada con agua destilada para remover las sales. El wpLL fue conservado a 4°C hasta su uso. Este protocolo de obtención de material de capa laminar fue puesto a punto en ³⁷.

Preparación de material soluble de CL (swLL)

El material soluble de CL se preparó a partir del material particulado (wpLL) previamente obtenido. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

Para preparar una suspensión de partículas de CL libre de proteínas del hospedero (principalmente anticuerpos que no se eliminaron durante el procesamiento de las paredes con NaCl 2M), se realizó un tratamiento proteolítico con pronasa. Se preparó una solución stock de 6 mg/ml de pronasa (*Protease*, Type XVI de *Streptomyces griseus*) en solución tampón Tris-HCl 20 mM CaCl2 0,1 mM, pH 8.0, pre-incubada durante 1 hora a 37°C para eliminar eventuales actividades enzimáticas contaminantes. La suspensión de wpLL se lavó 3 veces en solución tampón Tris-HCl 20 mM CaCl₂ 0,1 mM, pH 8.0 y luego se resuspendió a una concentración de 5 mg/ml. A una fracción del preparado se le agregó solución pronasa a concentración final 0,125 mg/ml. Concomitantemente, como control del tratamiento, la fracción restante se resuspendió en las mismas condiciones pero sin pronasa.

Ambas preparaciones se incubaron durante 24 horas a 37° C con agitación constante, y posteriormente se lavaron 5 veces con NaCl 2 M CaCl₂ 0,1 mM, para remover la pronasa. Finalmente, se realizaron 7 lavados con PBS CaCl₂ 0,1 mM para su conservación en la solución tampón de trabajo.

Luego, los materiales fueron solubilizados a través de 3 ciclos de sonicación de 1 minuto a 60 watts de potencia, con pausas de 30 segundos entre ciclos. Para remover la fracción no solubilizada, se realizó una centrifugación 10 minutos a 10000 x g, conservando los sobrenadantes a 4°C hasta su uso. Los materiales obtenidos fueron denominados "swLL pronasa" (muestra sometida al tratamiento con pronasa) y "swLL" (muestra sometida al tratamiento control). Para verificar la correcta eliminación de las proteínas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE; tesis de doctorado Leticia Grezzi, en curso).

3.2 Experimentos in vivo

Administración in vivo de wpLL

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6, hembras, de 8-10 semanas de edad, provenientes de la División de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DILAVE, MGAP; Uruguay), y se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Higiene (UdelaR, Uruguay). Se trabajó con dos grupos experimentales con 5 individuos cada uno, cantidad mínima necesaria para aplicar un test estadístico no paramétrico.

Los animales se inocularon vía intraperitoneal (ip) utilizando jeringas de calibre 23 G con 50 µg de masa seca de wpLL/ratón en 200 µl de PBS 0,1 mM CaCl2 o con un volumen igual de vehículo. Se realizaron 5 inyecciones administradas de manera bisemanal, en un período total de 2.5 semanas (protocolo puesto a punto por Leticia Grezzi durante sus estudios de Doctorado). Ambos grupos se mantuvieron en el bioterio en idénticas condiciones durante el transcurso del experimento. Tras 24 horas de la última inyección, los animales se sometieron a eutanasia (con el anestésico inhalatorio isofluorano) y se realizaron los lavados peritoneales, y las extracciones de sangre, bazo y nodos linfáticos mesentéricos. Cada procedimiento se detalla por separado a continuación.

Toda la manipulación de los animales vivos fue realizada por Cecilia Casaravilla (categoría B y C2 de la CNEA). El protocolo correpondiente al modelo de inyecciones de wpLL fue aprobado por el Comité

Honorario de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA, UdelaR) (101900-000891-19)(*Figura 5*).



Figura 5. Representación gráfica del esquema de inyecciones y posterior toma de muestras.

3.3 Extracción de muestras biológicas

Lavado peritoneal

Se realizaron 2 lavados peritoneales, cada uno con 5 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 2,0 g/l de bicarbonato de sodio, antibiótico/antimicótico (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y 0.2% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) previamente inactivado (56 °C por 30 minutos). La concentración de células fue cuantificada utilizando el contador automático S6 *Universal Analyzer* - CTL, Inmunospot. La viabilidad fue estimada utilizando una solución comercial de naranja de acridina y ioduro de propidio. Las células se mantuvieron en hielo hasta su análisis por citometría de flujo.

Extracción de sangre y obtención de sueros

La extracción de sangre se realizó desde la vena cava inferior utilizando una jeringa de 1 mL con aguja de 27 G. La sangre se dejó coagular por 1 hora a 37°C, seguido por 2 horas a 4°C. Luego se la centrifugó a 10000 g por 10 min a 4°C. Se recuperó el suero, que se centrifugó nuevamente para remover posibles restos de coágulos. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20°C.

Procesamiento de bazo y nodos mesentéricos

El procesamiento de ambos órganos se realizó en condiciones de esterilidad. Para obtener las células en suspensión, las muestras fueron disgregadas entre dos mallas de serigrafía de 85 μ m inmersas en 4 ml de medio RPMI sin suero. Las células recuperadas se centrifugaron a 350 g por 5 minutos a 4°C. En el caso de los nodos mesentéricos, luego del lavado, las células se suspendieron en 2 ml de RPMI para su conteo (*ídem "Lavado peritoneal*"). Las células obtenidas del bazo, se incubaron con 3 ml/bazo de cloruro de amonio (NH₄Cl) 0.168M durante 2 minutos, con agitación, para lisar los eritrocitos. Luego, se agregaron 30 ml de RPMI para diluir el reactivo de lisis y las células se volvieron a centrifugar en las condiciones antes descritas. Finalmente, los esplenocitos se resuspendieron en 10 ml de RPMI para su conteo (*ídem "Lavado peritoneal*").

3.4 Procesamiento y análisis de las muestras obtenidas

Citometría de flujo

Para ser analizadas por citometría de flujo, las células del exudado peritoneal (PEC) se sembraron a razón de 0,35 x 10^6 células por pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo en V, y se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento. Previo a la tinción con los anticuerpos, las células se incubaron con 25 ul/pocillo de una mezcla conteniendo 1 µg/mL del anticuerpo anti-CD16/CD32 de ratón y 10% v/v de suero normal de rata, ambos en solución tampón para citometría (0.1% (m/v) BSA EDTA 2 mM en PBS), durante 20 minutos. Este paso se realiza con la finalidad de bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos a las células, particularmente a través de la unión a receptores Fc. Luego del bloqueo, las células se incubaron con 25 µl/pocillo de una mezcla de anticuerpos conjugados a fluorocromos, para marcar las moléculas de superficie de interés (*Tabla 1*) durante 40 minutos. Es válido aclarar que debido al número limitado de detectores del citómetro FACS Canto II (BD Biosciences), se decidió no

incluir en el panel de tinción una sonda de viabilidad. Esto se hizo basado en resultados previos obtenidos por Leticia Grezzi en los que se observó que en estos ensayos se obtenía un alto porcentaje de la viabilidad celular (aproximadamente, 95%). A partir de este paso, las placas se mantuvieron protegidas de la luz. Luego de la tinción se realizaron dos lavados por centrifugación con solución tampón de citometría, y las células se fijaron con 100 µl de paraformaldehído 1% (m/v) en PBS pH 7.2 por 20 minutos. Tras dos lavados más, las células se resuspendieron en 75 µL/pocillo de la misma solución tampón hasta su análisis en el citómetro.

Para las tinciones intracelulares, luego del paso de fijación, las células se lavaron 2 veces con solución de tampón de permeabilización (eBioscience, Thermo) y se incubaron toda la noche en 100 µl de la misma solución. Posteriormente, las células se centrifugaron e incubaron con 50 µl/pocillo de los anticuerpos de interés conjugados a fluorocromos o a biotina (cuya unión se reveló mediante una incubación posterior con estreptavidina conjugada a un fluorocromo), durante 40 minutos. Luego se realizaron dos lavados con solución tampón de permeabilización y se resuspendieron en solución tampón de citometría.

Durante todo el protocolo de marcado para citometría de flujo los lavados por centrifugación se realizaron a 350 g por 5 minutos a 4°C.

Para el análisis de marcadores cuyo nivel de expresión en las células no era previamente conocido (PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, CD206, Relm α , Ym1, E492) se realizaron controles FMO (Fluorescence Minus One): se incubó un pool de muestras de cada grupo con todos los anticuerpos empleados en la tinción, exceptuando aquel dirigido contra la molécula de interés. Este control sirve para corregir la superposición de los espectros de emisión entre los fluoróforos a utilizar.

Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACS Canto II (BD Biosciences) y analizadas con el software FlowJo 7.6.

MARCADO DE SUPERFICIE							
Marca	Clona	Anticuerpo	Fluorocromo	Dilución final	Reactivo secundario		
BioLegend	AF598	Anti-CD115 AF 488 1/200		-			
BioLegend	w19396d	Anti-CD103	APC	1/200	-		
BioLegend	4B12	Anti-CCR7	APC	1/200	-		
BioLegend	H57-597	Anti-TCRb	APC Cy7	1/200	-		
BioLegend	CD5	Anti-CD19	APC Cy7	1/200	-		
BioLegend	BN8	Anti-F4/80	APC Cy7	1/300	-		
Invitrogen	122	Anti-PDL2	Anti-PDL2 SV 436 1/200		-		
BioLegend	M1/70	Anti-CD11b	BV510	1/400	-		
eBioscience	GL1	Anti-CD86	PE	1/200	-		
eBioscience	16-10a1	Anti-CD80	PE	1/200	-		
eBioscience	N418	Anti-CD11c	PE Cy7	1/200	-		
eBioscience	mih5	Anti-PDL1	PE	1/200	-		
BioLegend	m5/114.15.2	Anti-MHCII	PerCP	1/200	-		

Tabla 1.	Listado de	los anticuerpos	v reactivos	utilizados en el	l análisis por	citometría (de fluio

MARCADO	INTRACELULAR	

Marca	Clona	Anticuerpo	Fluorocromo	Dilución final	Reactivo secundario
RnD	lgG policlonal de cabra	Anti-Ym1-biotina	-	1/400	Estreptavidina conjugada a APC (1/200)- ebioscience (Thermo)
Producido en el laboratorio	lgG3 monoclonal de ratón	E492-biotina		1/500	Estreptavidina conjugada a BV 421 (1/200) BioLegend
BioLegend	C068c2	Anti-CD206	PE	1/400	-
PeproTech	Anticuerpo policlonal de conejo	Anti-Relm α	-	1/200	Kit IgG de conejo ZenónTM conjugado a PE - Invitrogen (Thermo)

Estrategia de definición para análisis de citometría de flujo

Las células fueron definidas en función de su complejidad y tamaño (SSC vs FSC), seguido por la selección de eventos simples en FSC-H vs FSC-A. Las células CD19⁺, TCR β^+ , F4/80⁺ fueron excluidas del análisis, descartando así linfocitos B, linfocitos T y macrófagos, respectivamente. Se excluyeron también a los eosinófilos, identificados por su patrón característico en SSC vs FSC. Las DC fueron definidas como la población CD11c⁺ MHCII^{*alto*}. Dentro de las mismas, se identificaron 3 subpoblaciones. Las células cDC1 se definieron como CD103⁺. Las moDC/SPM se definieron dentro de las células CD103⁻ como eventos CD115⁺, y las cDC2 se definieron como los eventos CD115⁻ (ver *Figura 6*).



Figura 6. Ejemplo de estrategia de definición de las subpoblaciones de DC. Las DC se definieron como CD11c⁺ MHCII^{alto}. Dentro de la población total las cDC1 se definieron como CD103⁺. Las moDC/SPM se definieron dentro de las células CD103⁻ como eventos CD115⁺, y las cDC2 se definieron como los eventos CD115⁻.

3.5 Cuantificación de la respuesta serológica

Detección de Inmunoglobulinas G y M

En los sueros obtenidos, se midió la presencia de anticuerpos IgM e IgG totales, y las subclases IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3 a través de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima indirecto (ELISA indirecto, por su sigla en inglés) (*Figura 7*). Para ello, se sensibilizaron placas de alta afinidad (Greiner) con 10 µg/pocillo de swLL o swLL pronasa en 50 µl de PBS, incubando toda la noche a 4°C. Luego, se realizó un paso de bloqueo con 100 µl/pocillo de 1% (m/v) BSA en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Más tarde, se sembraron 50 µl/pocillo de las muestras de suero en la dilución inicial indicada en la *Tabla 2*. A partir de esta dilución se realizaron 4 diluciones seriadas al 1/2 (para IgM se realizaron diluciones al 1/3) y se incubó toda la noche a 4°C. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo de detección correspondiente en concentración 0,1 µg/ml, por 1 hora a 37°C, y luego con el conjugado de estreptavidina-HRP 1 µg/ml (Thermo) por 1 hora a temperatura ambiente. Entre cada paso se realizaron entre 3 y 5 lavados con PBS- 0,05 % (m/v) Tween- 20. Todas las diluciones fueron realizadas utilizando 1% (m/v) BSA en PBS. Finalmente, el desarrollo de color se obtuvo utilizando 100 µl Buffer acetato pH 5, 0.1 mg/ml tetrametilbencidina (TMB), 0.005% (v/v) H₂O₂ como sustrato. Se detuvo la reacción colorimétrica con 50 µl de H₂SO₄ 2 N. Se midió la densidad óptica a 450 nm.



Figura 7. Esquema de ELISA indirecto utilizado para la detección de IgM e IgG totales, y las subclases, IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3. BSA: Seroalbúmina bovina, swLL: partículas de la capa laminar solubles, Ig: inmunoglobulina, TMB: tetrametilbencidina, H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

Detección de Inmunoglobulina E

Para la cuantificación de IgE se realizó un ensayo ELISA de captura (*Figura 8*). Primero, se sensibilizó una placa de alta afinidad (Greiner) con 50 μ l/pocillo del anticuerpo de captura (*Tabla 2*) a una concentración de 2 μ g/ml en PBS y se incubó toda la noche a 4°C. Segundo, se bloquearon los pocillos con 100 μ l de 1% (m/v) BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Tercero, se sembraron 50 μ l/pocillo de las muestras de suero o del estándar (Tabla 2) y se realizaron 4 diluciones seriadas al medio a partir de las mismas. Se incubó toda la noche a 4°C. Luego, se incubaron los pocillos con 50 μ l del anticuerpo de detección a una concentración de 2 μ g/ml, por 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se llevó a cabo la incubación con el conjugado de estreptavidina-HRP y el revelado de la placa de manera idéntica a lo realizado en *"Detección de inmunoglobulina G y M"*. Todas las diluciones fueron realizadas utilizando 1% (m/v) BSA en PBS.



Figura 8. Esquema del ELISA de captura utilizado para la detección de IgE. BSA: Seroalbúmina bovina, Ig: inmunoglobulina, TMB: tetrametilbencidina, H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno

Marca	Inmunoglobulina	Tipo de ELISA utilizado	Anticuerpo de captura*	Dilución inicial del suero**	Diluciones seriadas**	Anticuerpo de detección**	Conjugado**
Southern Biotech	IgGs totales	Indirecto	-	1:100	1/2	Anti IgG de ratón (origen cabra) (0,05 μg/ml)	Estreptavidina -HRP (1 μg/ml)
Southern Biotech	lgG1	Indirecto	-	1:500	1/2	Anti IgG1 de ratón (origen cabra) (0,1 μg/ml)	Estreptavidina -HRP (1 μg/ml)
Southern Biotech	lgG2b	Indirecto	-	1:10	1/2	Anti IgG2b de ratón (origen cabra) (0,1 μg/ml)	Estreptavidina -HRP (1 µg/ml)
Southern Biotech	lgG2c	Indirecto	-	1:10	1/2	Anti IgG2c de ratón (origen cabra) (0,1 μg/ml)	Estreptavidina -HRP (1 μg/ml)
Southern Biotech	lgG3	Indirecto	-	1:20	1/2	Anti IgG3 de ratón (origen cabra) (0,1 μg/ml)	Estreptavidina -HRP (1 μg/ml)
Southern Biotech	IgM	Indirecto	-	1:10	1/3	Anti-IgM de ratón conjugado a peroxidasa (0,1 μg/ml)	-
BD Pharmingen	IgE	Captura	Anti IgE de ratón (2 ug/ml)	1:50	1/2	Anti IgE de ratón biotinilado (origen rata) (2ug/ml)	Estreptavidina -HRP (1 µg/ml)

 Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados para la detección de inmunoglobulinas por ELISA.

*Se utilizó PBS como disolvente.

** Se utilizó 1% (m/v) BSA en PBS como disolvente

Re-estimulación in vitro de células de bazo y nodo linfático mesentérico

Se cultivaron 2 x 10⁶ células de bazo o de nodo mesentérico por pocillo (volumen final 200 μ l) en placas de cultivo de 96 pocillos (Greiner) en medio RPMI suplementado con 10 % (v/v) SFB, HEPES 10 mM, beta-mercaptoetanol 55 μ M y mezcla de antibiótico/antimicótico (medio de re-estimulación). Se estudiaron 4 condiciones de re-estimulación: anti-CD3 2 μ g/ml (estímulo policional), wpLL 20 μ g/pozo, swLL 20 μ g/ml y swLL pronasa 20 μ g/ml, diluídos en medio de re-estimulación. En cada pocillo conteniendo 100 μ l de células se agregaron otros 100 μ l de la solución de estimulación correspondiente. Como control de ausencia de estímulo, se agregó el mismo volúmen de medio de re-estimulación. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ por 72 horas. El sobrenadante recuperado se almacenó a -20°C para el posterior análisis de citoquinas.

Cuantificación de citoquinas en solución mediante ELISA

Se cuantificaron las citoquinas presentes en los sobrenadantes recuperados tras la re-estimulación in vitro de células de bazo y nodo mesentérico mediante ELISA. Se utilizaron kits comerciales y los ELISAs se llevaron adelante de acuerdo a las instrucciones del fabricante: para IL-13, IL-17, IL-10, IL-4 e IFN-γ se usó el sistema de DuoSet[™] de RnD Systems, para IL-5 se usó el kit OptEIA[™] de BD Biosciences. A continuación se enumeran, de manera general, los pasos que se realizaron. En la Tabla *3* se provee información más detallada. En primer lugar, se sensibilizaron placas de 96 pocillos con 50 µL/pocillo del anticuerpo de captura correspondiente diluído en la solución tampón indicada por el fabricante durante toda la noche a 4°C. En segundo lugar, se bloquearon los pocillos con 100 μL de PBS 1 % (m/v) BSA o PBS 10 % (v/v) SFB, y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo se utilizó como disolvente en los siguientes pasos. Luego, se incubaron los pocillos con 50 µL de los sobrenadantes del cultivo de esplenocitos o células de los nodos, o diluciones seriadas de la solución estándar por 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron los pocillos con 50 μL del anticuerpo de detección por 2 horas a temperatura ambiente, y luego, con 50 μL de estreptavidina conjugada a peroxidasa por 20 minutos a temperatura ambiente, manteniendo a la placa protegida de la luz. El revelado de la placa se realizó de manera idéntica a lo detallado en "Detección de inmunoglobulina G y M". En la Tabla 3 se proporcionan las concentraciones utilizadas para cada anticuerpo y las soluciones tampón utilizadas.
Tabla 3. Diluciones utilizadas para los ELISAS de determinación de citoquinas y soluciones tampón utilizadas.

Citoquina	Anticuerpo de captura	Bloqueo	Estándar Concentración máxima (pg/mL)	Anticuerpo de detección	Estreptavidina peroxidasa	Marca del kit y número de catálogo
IL-13	1:120 en PBS	1% (m/v) BSA en PBS	4000	1:60 en 1% BSA en PBS	1:40 en 1% BSA en PBS	RnD DY413
IL-17	1:120 en PBS	1% (m/v) BSA en PBS	1000	1:60 en 1% BSA en PBS	1:40 en 1% BSA en PBS	RnD DY421
IL- 10	1:120 en PBS	1% (m/v) BSA en PBS	2000	1:60 en 1% BSA en PBS	1:40 en 1% BSA en PBS	RnD DY417
IL-4	1:120 en PBS	1% (m/v) BSA en PBS	1000	1:60 en 1% BSA en PBS	1:40 en 1% BSA en PBS	RnD DY404
IFN-γ	1:120 en PBS	0.1% (m/v)BSA, 0.05% (m/v) Tween 20 en Buffer Tris	2000	1:60 en 0.1% BSA, 0.05% Tween 20 en Buffer Tris	1:40 en 0.1% BSA, 0.05% Tween 20 en Buffer Tris	RnD DY485
IL-5	1:250 en buffer carbonato	10% SFB (m/v) en PBS	1000	1:250 en 10% FBS en PBS*	1:250 en 10% SFB en PBS*	BD 555236

*en IL-5 se incuban juntos el anticuerpo de detección y el conjugado.

3.6 Análisis estadístico

La comparación entre dos grupos experimentales se realizó a través del método no paramétrico de Mann-Whitney. Cuando el experimento implicó más grupos experimentales se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Cuando el test de Kruskal-Wallis detectó un efecto significativo (p< 0,05), se realizó el post-test de Dunn y los valores P fueron ajustados por el método de Bonferroni. En todos los casos el análisis fue realizado utilizando el programa Graphpad Prism. Los símbolos *, ** y *** representan valores p menores a 0.05; 0.01 y 0.001, respectivamente.

3. RESULTADOS

Como se mencionó previamente, nuestro grupo de investigación puso a punto un modelo de inyecciones repetidas de partículas derivadas de la CL (wpLL) en la cavidad peritoneal de ratones, observándose la inducción de una respuesta inmune local inmunosuprimida, con características muy similares a la generada durante la infección experimental por el parásito *E. granulosus s.s.* En dicho trabajo se abordó, con particular énfasis, la caracterización de las poblaciones de monocitos/macrófagos locales.

El objetivo del presente trabajo fue profundizar en la caracterización de este modelo, evaluando los efectos sobre las DC, un tipo celular de la inmunidad innata clave para la modulación de la respuesta inmune. Así, se estudiaron las DC de la cavidad peritoneal, evaluando la expresión de diversos marcadores que dan evidencia de su respuesta al material parasitario, y analizando diferencias entre las subpoblaciones de DC. Como estas células cumplen un rol fundamental en la comunicación entre el sistema inmune innato y el adaptativo, en este trabajo también se estudiaron elementos de la respuesta adaptativa, tales como la producción de citoquinas por parte de las células T de bazo y nodo linfático drenante del tejido, y la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B.

3.1 Caracterización de células dendríticas en la cavidad peritoneal

Análisis de la población global de células dendríticas

A partir de las células (PEC) obtenidas en los lavados peritoneales, se realizó el análisis de las DC por citometría de flujo. La estrategia de definición de las células se explicó en detalle en el apartado de Materiales y Métodos (Ver *Figura 2*). Brevemente, luego de definir la población de células totales y los eventos simples, se excluyeron a los linfocitos B, linfocitos T, macrófagos, y eosinófilos. Las células dendríticas fueron definidas como la población CD11c⁺ MHCII ^{alto}.

Los resultados obtenidos determinaron que la población de DC del grupo inyectado con wpLL aumentó significativamente su tamaño respecto al grupo inyectado con PBS (control) (*Figura 9A*). Sin

embargo, este aumento no implicó un cambio en cuanto al porcentaje que representan las DC dentro de PEC totales (*Figura 9B*).



Figura 9. La población de DC aumenta en tamaño, pero no en porcentaje, tras las inyecciones repetidas de wpLL. Análisis por citometría de flujo de las DC (definidas como eventos CD11c⁺ MHCII^{alto}) de la cavidad peritoneal de ratones que recibieron 5 inyecciones repetidas wpLL o PBS 0.1 mM CaCl₂ (control). A) Cantidad de DC (N° de células) en la cavidad peritoneal. B) Porcentaje (%) que representan las DC en la totalidad de las células de la cavidad peritoneal. En los gráficos se indica la mediana del grupo de valores. Los diferentes colores representan datos obtenidos en tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó a través del método no paramétrico de Mann-Whitney. Los símbolos *** representan valores p menores a 0.001.

Además, se caracterizó el fenotipo de las DC en términos de la expresión de CD80, CD86, CCR7, CD206, Relm- α , Ym-1, PD-L1 y PD-L2.

CD80 y CD86 son moléculas co-estimuladoras claves para la activación de los linfocitos T en los órganos linfoides secundarios, mientras que CCR7 es un receptor de quimioquinas que participa en la migración de las DC hacia dichos órganos. Se espera que la expresión de estos tres marcadores aumente tras una activación inflamatoria de las DC ¹⁶. PD-L1 y PD-L2 son moléculas co-inhibidoras asociadas a la regulación negativa de la respuesta de los linfocitos T efectores ⁴⁶, por lo que se

utilizaron para evaluar la inducción de un perfil inmunosupresor en las DC. Aumentos en la expresión de CD206, Relm- α , y/o Ym-1 se asocian a la activación alternativa de las células ^{47,48}.

Para evaluar los posibles cambios en el nivel de expresión, se tuvieron en cuenta dos parámetros que aportan información complementaria. Por un lado, se consideró el porcentaje de DC positivas para el marcador de interés (*Figura 10*). En segundo lugar, se estudió el nivel de expresión del marcador (*Figura 11*). Éste fue definido como la diferencia de las medias geométricas de la intensidad de fluorescencia entre la población negativa y la positiva. Como se detalló en la sección "*Materiales y Métodos*", el umbral que determina el límite entre estas poblaciones se obtuvo utilizando controles FMO.

La expresión de los marcadores se evaluó en tres experimentos independientes. No obstante, no en todos los experimentos fue posible cuantificar todos los marcadores. En este sentido, la expresión de CD80 fue cuantificada en dos ensayos, mientras que la de CD206, Relm- α , Ym-1 y CCR7 en uno solo. La tinción con CCR7 no resultó exitosa (posiblemente, por una falla en el reconocimiento del anticuerpo utilizado), por lo que no pudieron obtenerse resultados para este parámetro.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 10* (porcentaje de células positivas) y la *Figura 11* (nivel de expresión). En el grupo inyectado con wpLL, se observó una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de DC que expresan CD80 en uno de los experimentos y una tendencia similar en el segundo. El porcentaje que expresa CD86 no aparenta cambios (sólo en uno de tres experimentos resultó estadísticamente significativo, mientras que en los otros dos no se identifica una tendencia clara). Al evaluar el nivel de expresión de las moléculas en las DC, CD86 aumentó significativamente en los tres experimentos realizados. En relación a la expresión de PD-L1 y PD-L2, se observó un aumento estadísticamente significativo de ambos co-inhibidores, tanto en términos de porcentaje de DC que los expresan (en dos y tres experimentos, respectivamente) como en el nivel de expresión de PD-L2 (en dos experimentos). El nivel de expresión de PD-L1 solo mostró cambios significativos en uno de los experimentos, aunque en los otros dos se observó una tendencia al aumento. Los marcadores de activación alternativa se cuantificaron en una única instancia, observándose un aumento significativo del porcentaje de DC que expresan Relm- α , CD206 y Ym1, y del nivel de expresión de Relm- α y Ym-1.



Figura 10. Las inyecciones repetidas de wpLL en la cavidad peritoneal aumentan el porcentaje de DC que expresan los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2 y los marcadores de activación alternativa Relm- α , CD206 y Ym1. Se muestra, dentro de la población global de DC, el porcentaje de células que expresan los marcadores estudiados: CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, CD206, Relm- α y Ym-1. Se muestran por separado los resultados de 1 a 3 experimentos independientes, indicándose la mediana del grupo de valores obtenidos. El análisis estadístico se realizó a través del método no paramétrico de Mann-Whitney. Los símbolos * y ** representan valores p menores a 0.05, y 0.01, respectivamente.



Figura 11. Las inyecciones de wpLL causan un aumento en el nivel de expresión de los marcadores de activación CD80 y CD86, de la molécula co-inhibidora PD-L2, y de los marcadores de activación alternativa Relm- α y Ym1 en las DC. Se determinó el nivel de expresión de cada marcador en la población de DC, calculado como la diferencia de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia entre la población negativa y la positiva. Se evaluó la expresión de CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, Relm- α , CD206, y Ym-1. Se muestran por separado los resultados de 1 a 3 experimentos independientes, indicándose la mediana del grupo de valores obtenido. El análisis estadístico se realizó a través del método no paramétrico de Mann-Whitney. Los símbolos * y ** representan valores p menores a 0.05 y 0.01, respectivamente.

Análisis de las subpoblaciones de células dendríticas

Como se detalló previamente, la población de DC es heterogénea y con gran plasticidad funcional. Dentro de la misma es posible identificar subpoblaciones con cierto grado de especialización hacia diversos perfiles de respuesta. La primera subdivisión se basa en las diferencias respecto a su orígen, dividiéndose cDC o moDC. A su vez, dentro de las cDC se distinguen dos subpoblaciones principales, las cDC1 y las cDC2. Para la identificación de las tres poblaciones se utilizó, además de CD11c y MHCII, otros dos marcadores fenotípicos: CD103 y CD115. Las cDC1 presentes en tejidos no linfoides (cDC1 migratorias) se caracterizan por la expresión de la integrina CD103, mientras que las cDC2 carecen de la misma. El ligando de CD103 es la E-cadherina, una molécula de adhesión expresada en las células epiteliales, por lo que su función está usualmente asociada a la retención de las células en tejidos periféricos⁴⁹. A su vez, las cDC2 se distinguen por la expresión de la integrina CD11b, ausente en las cDC1. CD11b es un receptor altamente versátil, siendo capaz de actuar como molécula de adhesión (por su interacción con integrinas del endotelio) y participando en procesos de fagocitosis (por reconocimiento de la opsonina iC3b) e inducción de tolerancia ⁵⁰. En el presente trabajo se incluyó la tinción con CD11b, pero no se obtuvieron resultados que permitieran diferenciar las poblaciones de cDC en relación a su expresión, por lo que no se utilizó para definirlas. Las moDC se distinguen por la expresión de CD115, carecen de la expresión de CD103 y podrían ser tanto CD11b⁺ como CD11b^{- 21,26,51-53}. CD115 es el receptor para CSF-1, factor de crecimiento que regula la diferenciación y supervivencia de células provenientes de linajes mieloides, particularmente, monocitos y macrófagos 54.

Resumiendo, las tres subpoblaciones de DC (CD11c⁺ MHCII^{alto}) fueron definidas de la siguiente manera:

- cDC1: CD11c⁺, MHCII^{alto}, CD103⁺, CD115⁻
- cDC2: CD11c⁺, MHCII^{alto}, CD103⁻, CD115⁻
- moDC: CD11c⁺, MHCII^{alto}, CD115⁺, CD103⁻

Es importante aclarar que dentro de la población definida como moDC también se encontrarán algunos macrófagos derivados de monocitos, particularmente la subpoblación de los macrófagos peritoneales denominada como SPM (del inglés, *small peritoneal macrophages*). Los SPM expresan CD115, bajos niveles de F4/80, altos niveles de MHCII, y algunos incluso CD11c ^{55–58}, por lo que no fue posible diferenciarlos de las DC en el proceso de definición implementado en este trabajo.

Dentro de las células definidas como CD11c⁺ MHCII^{alto} (DC totales), se identificó primero la subpoblación de cDC1 como la población CD103⁺ (*Figura 12*). Dentro de la población CD103⁻, se definió a las moDC/SPM como aquellas células CD115⁺ y a las cDC2 se las definió como las CD115⁻. Dentro de la población cDC1 se corroboró la ausencia de expresión de CD115.



Figura 12. Estrategia para la definición de las subpoblaciones de DC presentes en la cavidad peritoneal. Dentro de la definición general de las DC (CD11c⁺ MHCII^{alto}) (ver Figura 2 de Materiales y Métodos), las cDC1 se definieron como células CD103⁺. Dentro del grupo CD103⁻ se identificó la población de moDC/SPM como CD115⁺. Las células restantes se tomaron como correspondientes a la población cDC2. En la primera fila de imágenes (definición de DC) se muestra el análisis de un individuo representativo de cada grupo. Para la segunda y tercera fila (definición de subtipos de DC), se muestran los análisis de las células de todos los individuos de cada grupo superpuestos.

Los resultados obtenidos en dos experimentos independientes (*Figura 13*) mostraron que la población de cDC1 aumentó significativamente en número de células, pero no el porcentaje que representan dentro de las DC totales. Las cDC2 no aumentaron en cantidad, y el porcentaje que representan disminuyó significativamente con respecto a los controles. Las moDC aumentaron significativamente tanto en tamaño como en porcentaje (*Figura 13*).



Figura 13. Las inyecciones repetidas de wpLL en la cavidad peritoneal afectan las proporciones y número de las diferentes subpoblaciones de DC locales. En la Figura A se muestran los gráficos correspondientes al número (n°) de células de cada subtipo en cada grupo, los diferentes colores representan a los valores obtenidos en dos experimentos independientes. En los gráficos se resalta la mediana de los valores obtenidos. En la parte B, se muestran diagramas circulares que representan las proporciones correspondientes a cada subpoblación dentro de las DC totales (se indica la mediana y el rango de valores de cada grupo). cDC1: DC convencionales de tipo 1. cDC2: DC convencionales de tipo 2. moDC/SPM: DC derivadas de monocitos/small peritoneal macrophages. El análisis estadístico se realizó a través del método no paramétrico de Mann-Whitney. Los símbolos * y *** representan valores p menores a 0.05 y 0.001, respectivamente.

Expresión de marcadores moleculares en las subpoblaciones de células dendríticas

Para estudiar con mayor profundidad los cambios en la expresión de los marcadores moleculares observados previamente en la población de DC totales, se evaluaron los mismos dentro de cada una de las subpoblaciones. Debido a la incorporación de los marcadores fenotípicos para la identificación de las subpoblaciones de DC y al número limitado de detectores de fluorescencia del citómetro del laboratorio, sumado a que la cantidad de PEC totales obtenidas de los ratones controles representa una limitante, se decidió no realizar la evaluación de Relm- α y Ym-1.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14 (porcentaje de células positivas) y Figura 15 (nivel de expresión). En todas las subpoblaciones de DC disminuye significativamente el porcentaje de células que expresan CD80, mientras que su nivel de expresión aumenta. En cuanto a CD86, el porcentaje de cDC1 y moDc/SPM que expresan el marcador disminuye, mientras que su nivel de expresión aumenta en las cDC2 y en las moDC/SPM. Con respecto a PD-L1, el porcentaje de células positivas sólo muestra cambios significativos en la población de moDC/SPM, mientras que en las cDC1 y cDC2 solo se observa una tendencia a dicho aumento. Además, el nivel de expresión de PD-L1 aumenta significativamente en las cDC2, observándose una tendencia a dicho aumento en la población de moDC/SPM. En el caso de PD-L2, se observa que aumenta el porcentaje de células positivas en todas las subpoblaciones de DC, pero solo en las cDC1 este aumento se ve acompañado por un aumento significativo en el nivel de expresión. En la población de moDC/SPM también se observa una tendencia al aumento del nivel de expresión de PD-L2, pero la diferencia no alcanza niveles significativos. Finalmente, en el ensayo en el que se evaluó la expresión de CD206 no fue posible definir las células en relación a la expresión de CD103, ya que ambas tinciones utilizaban anticuerpos de detección conjugados al mismo fluorocromo. Por lo tanto, para este ensayo se realizó una definición distinta de las subpoblaciones, en la cual las DC fueron divididas exclusivamente en función a la expresión de CD115, definiendo a las moDC/SPM como CD115⁺ y a las cDC1 y las cDC2 como una población única, CD115⁻. En ambas se observó un aumento significativo del porcentaje de células que expresan CD206, sin cambios significativos en cuanto al nivel de expresión.



Figura 14. Las inyecciones repetidas de wpLL en la cavidad peritoneal afectan, en mayor o menor medida, las proporciones de las subpoblaciones de DC que expresan los diferentes marcadores de activación. Se evaluó la expresión de CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, y CD206. Se muestran los resultados obtenidos de 1 a 2 experimentos independientes, indicándose la mediana del grupo de valores obtenidos. DC1: DC convencionales de tipo 1. DC2: DC convencionales de tipo 2. moDC/SPM: DC derivadas de monocitos/small peritoneal macrophages. El análisis estadístico se realizó a través del método no paramétrico de Mann-Whitney. Los símbolos * y *** representan valores p menores a 0.05 y 0.001, respectivamente.



Figura 15. Las inyecciones repetidas de wpLL en la cavidad peritoneal afectan, en mayor o menor medida, la expresión de los diferentes marcadores de activación en las distintas subpoblaciones de DC. El nivel de expresión de los marcadores fue calculado como la diferencia de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia entre la población negativa y la positiva. Se evaluó el nivel de expresión de CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, y CD206. Se muestran los resultados obtenidos en 1 o 2 experimentos independientes, indicándose la mediana del grupo de valores obtenidos. DC1: DC convencionales de tipo 1. DC2: DC convencionales de tipo 2. moDC/SPM: DC derivadas de monocitos/small peritoneal macrophages. El análisis estadístico se realizó a través del método no paramétrico de Mann-Whitney. Los símbolos *, ** y *** representan valores p menores a 0.05; 0.01 y 0.001, respectivamente.

Finalmente, se evaluó la capacidad de las DC de internalizar a wpLL (*Figura 16*). Para ello, se utilizó el anticuerpo monoclonal E492, que reconoce motivos glucídicos presentes específicamente en la CL ⁵⁹. Se observó que la población de moDC/SPM es la que presenta un mayor porcentaje de células positivas para E492, determinándose una diferencia estadísticamente significativa respecto a las cDC1. No se obtuvo una diferencia significativa respecto a las cDC2, pero se observa una tendencia al aumento.



Figura 16. Las moDC representan las DC con mayor nivel de internalización de wpLL en la cavidad peritoneal. A través de la tinción intracelular con el anticuerpo E492 se estudió la internalización de wpLL por parte de las diferentes subpoblaciones de las DC de cavidad peritoneal. Se muestra el porcentaje de DC dentro de cada subpoblación positivas para el marcado con E492. Se muestran los resultados de 1 experimento, indicándose la mediana del grupo de valores obtenidos. DC1: DC convencionales de tipo 1. DC2: DC convencionales de tipo 2. moDC/SPM: DC derivadas de monocitos/small peritoneal macrophages. El análisis estadístico se realizó a través del método no paramétrico de Kruskal-Wallis, con pos test de Dunn.

3.2 Efectos en la respuesta de la inmunidad adaptativa

Respuesta de los linfocitos T en el bazo y los nodos linfáticos

Para evaluar la respuesta de los linfocitos T, se incubaron esplenocitos ó células de los nodos mesentéricos en medio de re-estimulación y luego se enfrentaron a 4 estímulos distintos: anti-CD3 (estímulo policional), wpLL, swLL y swLL pronasa. Como control se utilizó una condición sin re-estimulación (se agregó únicamente medio de re-estimulación). Luego de 72 horas se recuperó el sobrenadante, y se utilizó para la cuantificación de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ , para revelar el sesgo de respuesta inducido por las inyecciones repetidas de wpLL.

En la *Figura 17* se muestran los resultados obtenidos respecto a la producción de citoquinas por parte de los esplenocitos sin re-estimulación. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la secreción de las citoquinas IL-5, IL-10 e IL-13 en el grupo wpLL respecto al grupo control, indicando un sesgo de los linfocitos T hacia una respuesta Th2^{1,29,30}. A pesar de que la IL-4 también es clásicamente producida por las células Th2, no fue posible detectar su producción.



Figura 17. Las inyecciones repetidas de wpLL inducen en bazo una respuesta T polarizada a Th2. Cuantificación por ELISA de citoquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ en esplenocitos cultivados por 72 h en medio RPMI suplementado con 10 % (v/v) SFB, HEPES 10 mM, beta-mercaptoetanol 55 μ M y mezcla de antibiótico/antimicótico (condición sin re-estimulación). Se muestra la concentración de cada citoquina expresada en pg/ml para el grupo control (PBS) y el grupo inyectado con wpLL. Se muestran los resultados de 1 a 2 experimentos independientes, indicándose la mediana del grupo de valores obtenidos. El análisis estadístico (comparando grupo control e inyectado con wpLL para cada citoquina) se realizó a través del método no paramétrico de Mann-Whitney. Los símbolos ** y *** representan valores p menores a 0.01 y 0.001, respectivamente.

En cuanto a las re-estimulaciones con wpLL, swLL y swLL pronasa, no se observaron diferencias respecto a la condición sin re-estimulación para ninguna de las citoquinas evaluadas (resultados no mostrados). Respecto a la re-estimulación con anti-CD3, la misma tampoco resultó productiva.

Finalmente, no fue posible evaluar la respuesta de las células presentes en los ganglios mesentéricos en ninguna de las condiciones, ya que los niveles de producción de citoquinas resultaron por debajo del umbral de detección de los ELISAs utilizados.

Respuesta de los linfocitos B: Anticuerpos

Cuantificación de anticuerpos específicos contra wpLL: IgG, IgG2b, IgG2c, IgG3 e IgM

A partir del suero obtenido de los ratones inyectados con wpLL y los controles correspondientes, se cuantificaron los niveles de anticuerpos específicos contra la CL mediante ELISA.

Para la sensibilización del ELISA se utilizaron las dos preparaciones solubles de material de la CL: swLL y swLL pronasa. Es válido recordar que swLL pronasa carece de las proteínas provenientes del hospedero bovino, que se adsorben a la CL en el transcurso de la infección (para más detalle ver *"Materiales y Métodos"*). La sensibilización con los dos materiales se realizó con la finalidad de evaluar la respuesta de anticuerpos que fueran específicos contra material de la CL propiamente dicho (principalmente sus motivos glucídicos; anticuerpos cuantificables en los pozos sensibilizados por *"swLL* pronasa") y la contribución de los anticuerpos que pudieran reaccionar contra antígenos proteicos provenientes del hospedero bovino, estimable al comparar los títulos observados en pozos de ELISA sensibilizados con swLL.

Como se mencionó, la correcta eliminación de los antígenos proteicos bovinos por el tratamiento con pronasa se verificó mediante SDS-PAGE (realizado por Leticia Grezzi, tesis de doctorado en curso; resultados no publicados).

La cuantificación de los anticuerpos se realizó de manera comparativa, teniendo en cuenta el valor de la densidad óptica (DO) a 450 nm para una determinada dilución de suero. Para seleccionar dicha dilución, se midió la DO a 450 nm de cada anticuerpo en un rango de 4 diluciones seriadas, y se seleccionó aquella donde se apreciara con mayor claridad la diferencia entre el grupo control y el grupo wpLL. Se cuantificó el nivel serológico de IgM e IgG totales, y las subclases IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 (*Figura 18*).



Figura 18. Las inyecciones repetidas de wpLL inducen la producción de anticuerpos específicos contra componentes de la CL. Cuantificación por ELISA de los anticuerpos IgM e IgG, y sus subclases IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3. La sensibilización fue realizada con los preparados solubles de la CL swLL o swLL tratado previamente con pronasa (abreviado en los gráficos como swLL pro). En cada gráfico se muestra el valor de la densidad óptica (DO) a 450 nm a la dilución de suero seleccionada para la comparación (detallada debajo del título de cada gráfico). Se muestran los resultados de 1 a 2 experimentos independientes, indicándose la mediana del grupo de valores obtenidos. El análisis estadístico se realizó a través del método no paramétrico de Mann-Whitney. Los símbolos *, ** y *** representan valores p menores a 0.05; 0.01 y 0.001, respectivamente.

En el grupo de ratones inyectados con wpLL, se observó un aumento estadísticamente significativo de los niveles serológicos de las IgG totales, y de las subclases IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3. También se observó un aumento en los niveles de IgM. En el caso de IgG1 se observó un título de anticuerpos significativamente menor en la placa sensibilizada con swLL pronasa (ausencia de antígenos bovinos) respecto a la de swLL, indicando que hay producción de IgG1 específica contra dichos antígenos.

Cuantificación de IgE total

También se cuantificó el nivel serológico de IgE totales a través de un ensayo de ELISA de captura (*Figura 19*). Se utilizó un ensayo distinto de ELISA por la complejidad para medir IgE específica en un ensayo de ELISA de determinación de anticuerpos como los realizados previamente. La complejidad radica en la mayor abundancia de IgG e IgM respecto a IgE en el suero, que competirán con la IgE por los sitios de unión a swLL o swLL pronasa adsorbidos a la placa, impidiendo determinar su título. La realización de un ensayo para determinar la concentración de IgE totales es satisfactoria considerando que en los ratones control la presencia de IgE en suero es mínima, por lo que todas las IgE detectadas en los animales inyectados con wpLL provendrían de la respuesta a dicho material.



Figura 19. Las inyecciones repetidas de wpLL inducen un aumento en la producción de IgE total. Cuantificación por ELISA de captura de IgE. En la gráfica se muestra la concentración (ng/ml) de IgE en el suero. El análisis estadístico se realizó a través del método no paramétrico de Mann-Whitney. Los símbolos *, ** y *** representan valores p menores a 0.05; 0.01 y 0.001, respectivamente.

4. DISCUSIÓN

En trabajos de nuestro grupo de investigación se ha analizado la respuesta inmune a la larva de E. granulosus s.s. en los modelos de infección experimental ³⁴ y en el de inyecciones múltiples de partículas de la CL (wpLL) (Tesis de doctorado de Leticia Grezzi), siendo este último el modelo de estudio utilizado en el presente trabajo. En conjunto, los resultados indican que la inyección repetida de wpLL en la cavidad peritoneal de ratones replica fielmente los efectos locales inducidos sobre la respuesta inmune durante la infección experimental (también en cavidad peritoneal). Esto señala a la CL como fuerte responsable de los efectos de inmunosupresión ejercidos por el parásito. En general, en ambos modelos se observaron elementos indicativos de un estado de inmunosupresión, tales como el aumento de TGF- β e IL-1Ra (ambas citoquinas asociadas a efectos antiinflamatorios), expansión de la población de linfocitos Treg y linfocitos T efectores PD-1+, y una hipo-respuesta proliferativa en los linfocitos T (observada ex vivo tras el estímulo policional con anti-CD3). Además, se realizó un foco particular en la caracterización de las poblaciones de monocitos/macrófagos de la cavidad. Los resultados mostraron el crecimiento de poblaciones de monocitos/macrófagos con fenotipo M2-*like* con sesgo inmunosupresor, con aumento de la expresión de Ym-1 y Relm- α , PD-L1 y PD-L2. Estas poblaciones de monocitos/macrófagos podrían estar involucradas en la presentación de antígenos a los linfocitos T efectores que llegan a la cavidad, y mediante la expresión de los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2 podrían contribuir a la supresión de la respuesta de los mismos, y/o estimular la de los linfocitos Treg⁶⁰ (tesis de doctorado Leticia Grezzi, en curso), como se discutirá más adelante.

Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune desarrollados por los helmintos suelen operar sobre células del sistema inmune innato, como son los macrófagos y las DC, ambas importantes en el inicio de la respuesta inmune, y particularmente en las DC, claves en la inducción y modulación de la respuesta adaptativa ^{16,20,22,53,61}. Como se mencionó, en el marco del estudio del ambiente inmunosuprimido inducido por la inyección repetida de wpLL, se había caracterizado los efectos sobre las poblaciones de macrófagos, quedando pendiente ahondar en el estudio de su impacto sobre la poblaciones de DCs. El propósito de este trabajo fue evaluar este fenómeno para comenzar a comprender la posible contribución de estas células en la inducción del ambiente inmunosupresor inducido por wpLL, y en última instancia la hidátide de *E. granulosus*.

Los resultados de este trabajo muestran que las inyecciones de wpLL resultaron en un aumento en el número de DC de la cavidad peritoneal, duplicando su tamaño inicial. No obstante, el porcentaje respecto a la totalidad de las células de la cavidad se mantuvo constante, confirmando que las inyecciones causan una aumento general de la celularidad local ³⁹ (tesis de doctorado Leticia Grezzi).

La población de DC está compuesta por tres subpoblaciones con diversas especializaciones funcionales: cDC1, cDC2 y moDC. Estudiar los cambios en sus proporciones es fundamental para comenzar a comprender la contribución de cada subpoblación en la respuesta inmune tras las inyecciones de wpLL. Así, las moDC (indistinguibles de los SPM en el análisis realizado, por lo que todos los resultados refieren a la suma de ambas poblaciones) se convierten en la población de DC más abundante de la cavidad peritoneal luego de las 5 inyecciones de wpLL, representando cerca del 70% de las DC totales, tras cuadruplicarse en número. Esto evidencia el fuerte reclutamiento de monocitos que induce la inyección del material parasitario. En cuanto a las subpoblaciones de cDC de la cavidad, las cDC1 se duplican en número, pero su porcentaje permanece constante (cercano al 7%). En contraste, el número de cDC2 no presenta cambios, pero disminuye considerablemente su porcentaje (del 50% al 20%). Dos argumentos podrían explicar estos sucesos. Primero, es posible que las pre-DC reclutadas al tejido se diferencien preferencialmente en cDC1, explicando la falta de crecimiento en la población de cDC2. Segundo, es conocido que las DC de los tejidos, una vez activadas, migran a los nodos linfáticos drenantes para iniciar la respuesta adaptativa ¹⁶. Por tanto, es plausible que las pre-DC que llegan a la cavidad se diferencien tanto en cDC1 como en cDC2, pero, que en el contexto generado por la inyecciones de wpLL, se favorezca la activación y migración de las cDC2, viéndose consecuentemente subrepresentadas en la cavidad. Considerando que una de las principales funciones de las cDC2 se ha asociado a la inducción de una respuesta Th2^{20,25}, esta segunda opción parece ser la más probable. Debido a esta hipótesis, se evaluó la expresión de CCR7 en las DC para evaluar su capacidad migratoria. A pesar de que no se obtuvieron resultados productivos, será interesante retomar esta dirección en el futuro.

Con respecto al estudio del fenotipo inducido en las DC en respuesta a las inyecciones de wpLL, uno de los factores evaluados fue la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. Las DC aumentan la expresión de estas moléculas en su superficie en respuesta a señales de peligro, como parte de su programa de activación. Una vez activas, como ya se mencionó, las DC migran a los nodos linfáticos drenantes para iniciar la respuesta adaptativa, siendo CD80 y CD86 necesarias para activar a los linfocitos T¹⁶. Los resultados de la evaluación de la expresión de CD80 y CD86 mostraron que

todas las subpoblaciones de DC experimentaron una disminución (o tendencia a la misma) en el porcentaje de células positivas para dichos marcadores, acompañado por un aumento en los niveles de expresión de los mismos. La observación de una disminución en el porcentaje podría atribuirse a que las inyecciones de wpLL activarían a las DC (aumentando el nivel de expresión de CD80 y CD86), y una fracción de las mismas migrarían hacia los nodos linfáticos drenantes, lo cual se traduciría en una disminución del porcentaje de DC activadas en la cavidad peritoneal. Tanto las cDC1 como las cDC2 tienen la capacidad de migrar hacia los órganos linfoides periféricos ⁶². Las moDC, por su parte, al igual que los SPM que también están incluidos en este grupo, presentan una menor capacidad de migración respecto a las cDC, y usualmente permanecen en el tejido. Estas células podrían estar contribuyendo a la respuesta local mediante la secreción de citoquinas y la activación de linfocitos T efectores que llegan desde la circulación sanguínea.

De manera congruente a lo observado en los macrófagos (L. Grezzi, tesis de doctorado), el estudio del fenotipo de las DC totales tras las inyecciones de wpLL, reveló que las mismas sufren una activación alternativa, con aumento en los porcentajes de células positivas para Relm- α , Ym-1 y CD206. En experimentos in vitro, este fenotipo se ha asociado a la presencia de IL-4, una de las citoquinas características de la respuesta Th2⁴⁷. La expresión de Relm-α en las DC activadas por la infección por parásitos helmintos cumple un rol necesario para la inducción óptima de una respuesta Th2 y regulación de la respuesta Th1⁴⁷. Por su parte, Ym-1 es comúnmente expresado por células presentadoras de antígenos en la infección por ciertos parásitos gastrointestinales, y su expresión también se asocia a una respuesta Th2. Su función no es bien comprendida, pero se lo ha relacionado a efectos regulatorios de la respuesta inmune^{47,48,63}. El receptor de manosa CD206 es un PRR importante en la respuesta inmune, y se ha observado que su expresión aumenta en respuesta a citoquinas Th2. En varios modelos de infección por parásitos helmintos se ha observado que juega un importante rol en la internalización del material parasitario y participa en la modulación de la respuesta del hospedero, aunque se desconoce su mecanismo de acción ^{64,65}. La inducción de un fenotipo alternativamente activado en DCs en respuesta a partículas de la CL había sido previamente observada en ensayos in vitro con DC derivadas de médula ósea 45. Para analizar la activación alternativa en las subpoblaciones de DC únicamente se estudió la expresión del marcador CD206. Ésta se evaluó en las cDC como conjunto, sin identificar diferencias entre cDC1 y cDC2. Se observó que tanto las cDC como las moDC/SPM presentaron un aumento en el porcentaje de células CD206+, sin cambios apreciables respecto al nivel de expresión. Es válido mencionar el trabajo de Sohn y cols ²⁸, en el que se utilizó la expresión de CD206 para distinguir entre dos subpoblaciones dentro del grupo de células MHCII⁺CD11c⁺CD115⁺ (que en este trabajo se definieron como moDC/SPM). En la población CD206⁻ los investigadores observaron una morfología semejante a las DC, similar capacidad de presentación de antígenos, y la capacidad de generar linfocitos T activados parcialmente e inducir linfocitos Treg. Por otra parte, las células CD206⁺ presentaron una morfología más similar a la de los macrófagos y una mayor actividad endocítica y fagocítica. En suma, es posible que el aumento de DC que expresan marcadores de activación alternativa influencie el direccionamiento de la respuesta inmune.

Uno de los resultados más remarcables de este trabajo fue la observación de que todas las subpoblaciones de DC presentan un aumento (o tendencia al mismo) en el porcentaje de células que expresan PD-L1 y PD-L2, de forma semejante a lo observado previamente en macrófagos tanto en este modelo como en el de infección experimental (Tesis de Doctorado de Leticia Grezzi, en curso). Estas moléculas actúan como ligandos de PD-1, molécula que participa en la regulación negativa de la proliferación y activación de los linfocitos T efectores en los tejidos periféricos, y la inducción de linfocitos Treg en los nodos linfáticos ^{60,66}. PD-L1 puede expresarse en la superficie de una gran diversidad de células, mientras que la expresión de PD-L2 está limitada a macrófagos y DC. Se ha observado que la expresión de este par de moléculas co-inhibidoras es inducida de manera diferente en función al perfil de la respuesta inmune, observándose un sesgo hacia PD-L2 en el contexto de respuesta Th2⁶⁶. Durante su trabajo de doctorado (en curso), L. Grezzi determinó que luego de inyectar wpLL en forma repetida en la cavidad peritoneal, aumenta el porcentaje de linfocitos T CD4+ positivos para PD-1. De esta forma, las DC en el mismo sitio podrían interactuar con dicha población de linfocitos T, contribuyendo a la inhibición de sus funciones, y a la inmunosupresión local. Además, la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las cDC que llegarían a los nodos linfáticos podrían estar dando señales para la inducción de linfocitos Treg.

En cuanto a la interacción con el material de la CL, se observó que todas las subpoblaciones de DC fueron capaces de internalizar wpLL, destacándose las moDC/SPM. Esto no necesariamente implica que las cDC1 y cDC2 presenten una menor capacidad de internalizar las partículas. Como se mencionó anteriormente, estas dos poblaciones son capaces de migrar a los órganos linfoides secundarios tras su activación, por lo que puede ser que el porcentaje de estas células capaz de internalizar a wpLL no se vea correctamente representado al estudiar únicamente la cavidad. Para corroborar esto, sería interesante poder evaluar en el futuro la internalización del material de la CL por parte de las DC que se encuentran en los nodos linfáticos drenantes de la cavidad peritoneal.

El estudio de la respuesta T en los esplenocitos (en ausencia de re-estimulación) mostró un aumento en las citoquinas IL-5, IL-13 e IL-10, revelando un sesgo de la respuesta hacia un perfil Th2 similar al observado previamente en las células T de la cavidad peritoneal (Tesis de Doctorado de Leticia Grezzi, en curso). El sesgo a Th2 también se observa en infecciones experimentales y naturales ^{34,67,68}. Al estudiar la respuesta de los linfocitos T ante la re-estimulación, ya sea específica con el material parasitario o policional con anti-CD3, no se observó una respuesta diferencial respecto a la condición sin re-estimulación. Dos líneas de razonamiento podrían explicar el fenómeno acontecido. En primer lugar, es posible que las células presentadoras de antígeno presentes en la preparación de esplenocitos no sean capaces de interiorizar/procesar adecuadamente las preparaciones de la CL (wpLL, swLL, swLL pronasa) en las condiciones utilizadas. En contraposición, en la cavidad peritoneal, luego de la inyección de wpLL, existe una gran cantidad y diversidad de células que podrían contribuir a la degradación de wpLL, facilitando su internalización por las células presentadoras de antígenos en dicho contexto. En segundo lugar, es posible que las células presentadoras de antígeno sí sean capaces de internalizar y presentar el material, pero que las inyecciones repetidas con wpLL provoquen un estado exhausto o inactivo en los linfocitos T del bazo, que explique la ausencia de respuesta ante el estímulo. En el futuro, será muy interesante caracterizar este fenómeno.

En cuanto a la respuesta B inducida por las inyecciones de wpLL, se observó que se generan anticuerpos específicos contra elementos de la CL, observándose un aumento en las IgM, IgG totales y todas sus suclases (IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3). Al comprobar si alguna de las clases o subclases de anticuerpos poseía especificidad contra proteínas bovinas adsorbidas a la CL, se observó que únicamente aquellos de subclase IgG1 presentaban una unión diferencial al material. Adicionalmente, en los animales inyectados con wpLL se observó un aumento significativo de los niveles totales de IgE, indicativo de IgE específica contra el material parasitario. Este resultado era esperable, dada la respuesta Th2 inducida por el material, por la cual se favorece la producción de esta clase de anticuerpos. En la respuesta contra parásitos helmintos el perfil Th2 promueve el cambio de clase de anticuerpo hacia IgE e IgG1, principalmente asociado a la presencia de IL-4. La función de IgE se relaciona principalmente con la activación de eosinófilos, basófilos y mastocitos ^{69,70}. La IgG1 puede participar en funciones inhibitorias a través de interacciones mediadas por el receptor FC γ RIIb ⁷¹. La CL está principalmente compuesta por mucinas, así que es esperable que también induzca respuestas T-independientes, que suelen producir anticuerpos IgM, IgG2b e IgG3 de baja afinidad ^{72–74}, todos ellos aumentados en el modelo de estudio de este trabajo.

5. CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos, es posible proponer un presunto modelo del funcionamiento de las DC en el contexto del modelo de inyecciones repetidas de wpLL (*Figura 20*).

Tras las inyecciones de wpLL, las DC presentes en la cavidad peritoneal internalizarían las partículas y se activarían, aumentando el nivel de expresión de CD80 y CD86. A pesar que CD80 y CD86 se relacionan a una activación clásica de las células, su expresión se ve acompañada de un fuerte aumento en la expresión de marcadores de activación alternativa (CD206, Relm- α e Ym-1), sugiriendo un fenotipo de las DC polarizado a la inducción de respuestas de tipo 2⁴⁷. Además, las DC expresan PD-L1 y PD-L2, lo que les otorgaría funciones de tipo inmunosupresor. A medida que se activan, las cDC (cDC1 y cDC2) migrarían hacia los órganos linfoides secundarios, mientras que las moDC permanecerían mayormente en la cavidad peritoneal. En los nodos linfáticos, las cDC participarían en la inducción de la respuesta T, direccionándola, como ya se comentó, hacia un perfil Th2 (y eventualmente iTreg). Los linfocitos Th2 efectores migrarían luego a la cavidad peritoneal, en donde las subpoblaciones de DC que permanecieron en el tejido, junto a los macrófagos locales, les presentarían antígenos provenientes de wpLL, limitando su función efectora mediante los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2. La observación de una expansión en la población de linfocitos T PD-1+ en la cavidad (doctorado en curso de Leticia Grezzi), apoya esta hipótesis. Es posible que la relevancia de PD-L2 predomine por sobre la de PD-L1, considerando que su expresión fue más elevada, presenta una afinidad de unión a PD-1 seis veces mayor⁸ y varios estudios destacan la posible asociación entre PD-L2 y la respuesta Th2 47,66,75. Finalmente, las DC inducidas en respuesta a wpLL podrían activar y/o expandir poblaciones de linfocitos Treg. Resultados previos de la tesis de doctorado de Leticia Grezzi muestran que la población de Treg en la cavidad peritoneal aumenta tras las inyecciones de wpLL. Aunque aún no se tienen indicios de la inducción de iTreg en los órganos linfoides secundarios, la presencia de los mismos en la cavidad sugiere que podrían estar contribuyendo con la inmunosupresión establecida por el material parasitario o, incluso más allá, por el parásito per se.



Figura 20. Representación del modelo de funcionamiento de las DC propuesto. Tras las inyecciones repetidas de wpLL, las DC presentes en la cavidad peritoneal internalizan las partículas y se activan, aumentando la expresión de los co-estimuladores CD80 y CD86, los marcadores de activación alternativa CD206, Relm-α e Ym-1, y los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2. Las cDC1 y cDC2 migrarían a los nodos linfáticos donde participan en la inducción de la respuesta T, direccionándola hacia un perfil Th2. Ciertos linfocitos T CD4+ vírgenes podrían diferenciarse a Tregs inducidos (iTreg). Luego, los linfocitos Th2 efectores migrarían a la cavidad peritoneal. Allí, las DC, junto a macrófagos locales, les presentarían antígenos de wpLL, inhibiendo su actividad (mediante señales provenientes de los co-inhibidores PD-L1 y

PD-L2. Se utilizó una línea punteada para delimitar los bordes de aquellas moléculas cuyo rol aún no se conoce con certeza. También, las poblaciones de DC fueron representadas con distintos tamaños para denotar las diferencias en sus proporciones. cDC: cDC convencionales. cDC1: DC convencionales de tipo 1. cDC2: DC convencionales de tipo 2. moDC/SPM: DC derivadas de monocitos/small peritoneal macrophages. iTreg: linfocito T regulador inducido. Th2: Linfocito T colaborador de tipo 2.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Maizels, R. M. *et al.* Helminth parasites masters of regulation. *Immunol. Rev.* 201, 89–116 (2004).
- MacDonald, A. S., Araujo, M. I. & Pearce, E. J. Immunology of Parasitic Helminth Infections. Infect. Immun. 70, 427–433 (2002).
- McSorley, H. J. & Maizels, R. M. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 585–608 (2012).
- 4. Díaz, Á. *et al.* The laminated layer: Recent advances and insights into Echinococcus biology and evolution. *Exp. Parasitol.* **158**, 23–30 (2015).
- Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T. & Ito, A. Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.* 43, 1017–1029 (2013).
- Thompson, R. C. A. Biology and Systematics of Echinococcus. in *Advances in Parasitology* vol. 95
 65–109 (Elsevier, 2017).
- Thompson, R. C. A. & Jenkins, D. J. Echinococcus as a model system: biology and epidemiology. Int. J. Parasitol. 44, 865–877 (2014).
- 8. Wang, H. *et al.* Echinococcus granulosus infection reduces airway inflammation of mice likely through enhancing IL-10 and down-regulation of IL-5 and IL-17A. (2014).
- Wen, H. *et al.* Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, e00075-18 (2019).
- 10. Equinococosis. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis.
- Agudelo Higuita, N. I., Brunetti, E. & McCloskey, C. Cystic Echinococcosis. J. Clin. Microbiol. 54, 518–523 (2016).
- 12. Brunetti, E. & White, A. C. Cestode Infestations. Infect. Dis. Clin. North Am. 26, 421–435 (2012).
- Irigoín, F. *et al.* Unique precipitation and exocytosis of a calcium salt of *myo* -inositol hexakisphosphate in larval *Echinococcus granulosu* s. *J. Cell. Biochem.* **93**, 1272–1281 (2004).

- Díaz, A. *et al.* Understanding the laminated layer of larval Echinococcus I: structure. *Trends Parasitol.* 27, 204–213 (2011).
- Díaz, Á. Immunology of cystic echinococcosis (hydatid disease). *Br. Med. Bull.* (2017) doi:10.1093/bmb/ldx033.
- 16. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. Inmunobiología de Janeway. (s.n., S.l., 2014).
- Chen, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs.
 Oncotarget 9, 7204–7218 (2017).
- Repáraz, D., Hommel, M., Navarro, F. & Llopiz, D. The role of dendritic cells in the immune niche of the peritoneum. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 371 1–14 (Elsevier, 2022).
- Crotty, S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41, 529–542 (2014).
- 20. Durai, V. & Murphy, K. M. Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity* **45**, 719–736 (2016).
- 21. Poltorak, M. P. & Schraml, B. U. Fate Mapping of Dendritic Cells. Front. Immunol. 6, (2015).
- Cabeza-Cabrerizo, M., Cardoso, A., Minutti, C. M., Pereira Da Costa, M. & Reis E Sousa, C.
 Dendritic Cells Revisited. Annu. Rev. Immunol. 39, 131–166 (2021).
- Macri, C., Pang, E. S., Patton, T. & O'Keeffe, M. Dendritic cell subsets. Semin. Cell Dev. Biol. 84, 11–21 (2018).
- 24. Yin, X., Chen, S. & Eisenbarth, S. C. Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **39**, 759–790 (2021).
- Backer, R. A., Probst, H. C. & Clausen, B. E. Classical DC2 subsets and monocyte-derived DC: Delineating the developmental and functional relationship. *Eur. J. Immunol.* 53, 2149548 (2023).
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).

- 27. Phythian-Adams, A. T. *et al.* CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *J. Exp. Med.* **207**, 2089–2096 (2010).
- Sohn, M. *et al.* Two Distinct Subsets Are Identified from the Peritoneal Myeloid Mononuclear Cells Expressing both CD11c and CD115. *Immune Netw.* 19, (2019).
- 29. Babu, S. & Nutman, T. B. Immune Responses to Helminth Infection. in *Clinical Immunology* 437-447.e1 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00031-4.
- 30. Díaz, A. & Allen, J. E. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. *Eur. J. Immunol.* **37**, 3319–3326 (2007).
- Finkelman, F. D., Wynn, T. A., Donaldson, D. D. & Urban, J. F. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 420–426 (1999).
- McCormick, S. M. & Heller, N. M. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine* 75, 38–50 (2015).
- 33. Díaz, A., Casaravilla, C., Allen, J. E., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Understanding the laminated layer of larval Echinococcus II: immunology. *Trends Parasitol.* **27**, 264–273 (2011).
- Grezzi, L., Martínez, Y. E., Barrios, A. A., Díaz, Á. & Casaravilla, C. Characterization of the immunosuppressive environment induced by larval Echinococcus granulosus during chronic experimental infection. *Infect. Immun.* 92, e0027623 (2024).
- Jenkins, S. J. & Allen, J. E. Similarity and Diversity in Macrophage Activation by Nematodes, Trematodes, and Cestodes. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 1–14 (2010).
- Stevenson, M. M., Valanparambil, R. M. & Tam, M. Myeloid-Derived Suppressor Cells: The Expanding World of Helminth Modulation of the Immune System. *Front. Immunol.* 13, 874308 (2022).
- Casaravilla, C. *et al.* Unconventional Maturation of Dendritic Cells Induced by Particles from the Laminated Layer of Larval Echinococcus granulosus. *Infect. Immun.* 82, 3164–3176 (2014).

- Díaz, Á. *et al.* Immunology of a unique biological structure: the Echinococcus laminated layer.
 Protein Cell 14, 87–104 (2023).
- Grezzi, L., González, C., Díaz, Á. & Casaravilla, C. The Acute Inflammatory Potential of Particles From the *Echinococcus granulosus* Laminated Layer Is Moderated by Its Calcium Inositol Hexakisphosphate Component. *Parasite Immunol.* 46, e13040 (2024).
- Gottstein, B., Deplazes, P. & Aubert, M. Echinococcus multilocularis: immunological study on the 'Em2-positive' laminated layer during in vitro and in vivo post-oncospheral and larval development. *Parasitol. Res.* 78, 291–297 (1992).
- Walker, M. *et al.* Isolation and Characterization of a Secretory Component of Echinococcus multilocularis Metacestodes Potentially Involved in Modulating the Host-Parasite Interface. *Infect. Immun.* **72**, 527–536 (2004).
- 42. Breijo, M., Anesetti, G., Martínez, L., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Echinococcus granulosus: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation. *Exp. Parasitol.* **118**, 188–196 (2008).
- Rausch, R. Studies on the helminth fauna of Alaska. XX. The histogenesis of the alveolar larva of Echinococcus species. J. Infect. Dis. 94, 178–186 (1954).
- 44. Cucher, M. *et al.* Identification of Echinococcus granulosus microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int. J. Parasitol.* **41**, 439–448 (2011).
- 45. Casaravilla, C. Tesis de doctorado 'Capa laminar de la larva de Echinococcus granulosus: estructura e interacciones con macrófagos y células dendríticas'. (2011).
- 46. Ghosh, C., Luong, G. & Sun, Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J. Cancer* **12**, 2735–2746 (2021).
- 47. Cook, P. C. *et al.* Alternatively activated dendritic cells regulate CD4 ⁺ T-cell polarization in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9977–9982 (2012).
- 48. 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.* **73**, 385–394 (2005).

- 49. Xu, W., Bergsbaken, T. & Edelblum, K. L. The multifunctional nature of CD103 (αEβ7 integrin) signaling in tissue-resident lymphocytes. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **323**, C1161–C1167 (2022).
- 50. Lamers, C., Plüss, C. J. & Ricklin, D. The Promiscuous Profile of Complement Receptor 3 in Ligand Binding, Immune Modulation, and Pathophysiology. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
- 51. Durai, V. & Murphy, K. M. Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity* **45**, 719–736 (2016).
- 52. Schraml, B. U. & Reis e Sousa, C. Defining dendritic cells. Curr. Opin. Immunol. 32, 13–20 (2015).
- Segura, E. & Amigorena, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 34, 440–445 (2013).
- 54. Hamilton, J. A. & Achuthan, A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol.* **34**, 81–89 (2013).
- 55. Bain, C. C. *et al.* CD11c identifies microbiota and EGR2-dependent MHCII+ serous cavity macrophages with sexually dimorphic fate in mice. *Eur. J. Immunol.* **52**, 1243–1257 (2022).
- 56. Cassado, A. dos A., D'Império Lima, M. R. & Bortoluci, K. R. Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
- 57. Ghosn, E. E. B. *et al.* Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 2568–2573 (2010).
- Hargarten, J. C. *et al.* Farnesol remodels the peritoneal cavity immune environment influencing Candida albicans pathogenesis during intra-abdominal infection. *Infect. Immun.* **91**, e00384-23 (2023).
- 59. Dematteis, S. *et al.* Modulation of the cellular immune response by a carbohydrate rich fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in infected or immunized *Balb/c* mice. *Parasite Immunol.* **23**, 1–9 (2001).
- 60. Dyck, L. & Mills, K. H. G. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious
diseases. Eur. J. Immunol. 47, 765–779 (2017).

- Amon, L., Hatscher, L., Heger, L., Dudziak, D. & Lehmann, C. H. K. Harnessing the Complete Repertoire of Conventional Dendritic Cell Functions for Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics* 12, 663 (2020).
- Liu, J., Zhang, X., Cheng, Y. & Cao, X. Dendritic cell migration in inflammation and immunity. *Cell. Mol. Immunol.* 18, 2461–2471 (2021).
- 63. Kang, Q., Li, L., Pang, Y., Zhu, W. & Meng, L. An update on Ym1 and its immunoregulatory role in diseases. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
- 64. Paveley, R. A. *et al.* The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth Schistosoma mansoni and modulates IFNγ production. *Int. J. Parasitol.* **41**, 1335–1345 (2011).
- 65. van Die, I. & Cummings, R. D. The Mannose Receptor in Regulation of Helminth-Mediated Host Immunity. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
- Loke, P. & Allison, J. P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 5336–5341 (2003).
- 67. Smyth, J. & Heath, D. Pathogenesis of larval cestodes in mammals. (1970).
- De Biase, D. *et al.* Evaluation of the Local Immune Response to Hydatid Cysts in Sheep Liver. *Vet. Sci.* **10**, 315 (2023).
- 69. Hodgkin, P. D., Lee, J. H. & Lyons, A. B. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J. Exp. Med.* **184**, 277–281 (1996).
- 70. Logan, E., Chetty, A. & Horsnell, W. G. The Role of Antibody in Parasitic Helminth Infections. in *How Helminths Alter Immunity to Infection* (ed. Horsnell, W.) vol. 828 1–26 (Springer New York, New York, NY, 2014).
- Beneduce, C. *et al.* Inhibitory Fc-Gamma IIb Receptor Signaling Induced by Multivalent IgG-Fc Is Dependent on Sialylation. *Cells* 12, 2130 (2023).

- 72. Allman, D., Wilmore, J. R. & Gaudette, B. T. The continuing story of T-cell independent antibodies. *Immunol. Rev.* **288**, 128–135 (2019).
- Collins, A. M. IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunol. Cell Biol.* 94, 949–954 (2016).
- Deenick, E. K., Hasbold, J. & Hodgkin, P. D. Switching to IgG3, IgG2b, and IgA Is Division Linked and Independent, Revealing a Stochastic Framework for Describing Differentiation1. *J. Immunol.* 163, 4707–4714 (1999).
- 75. Stempin, C. C. *et al.* PD-L2 negatively regulates Th1-mediated immunopathology during Fasciola hepatica infection. *Oncotarget* **7**, 77721–77731 (2016).