

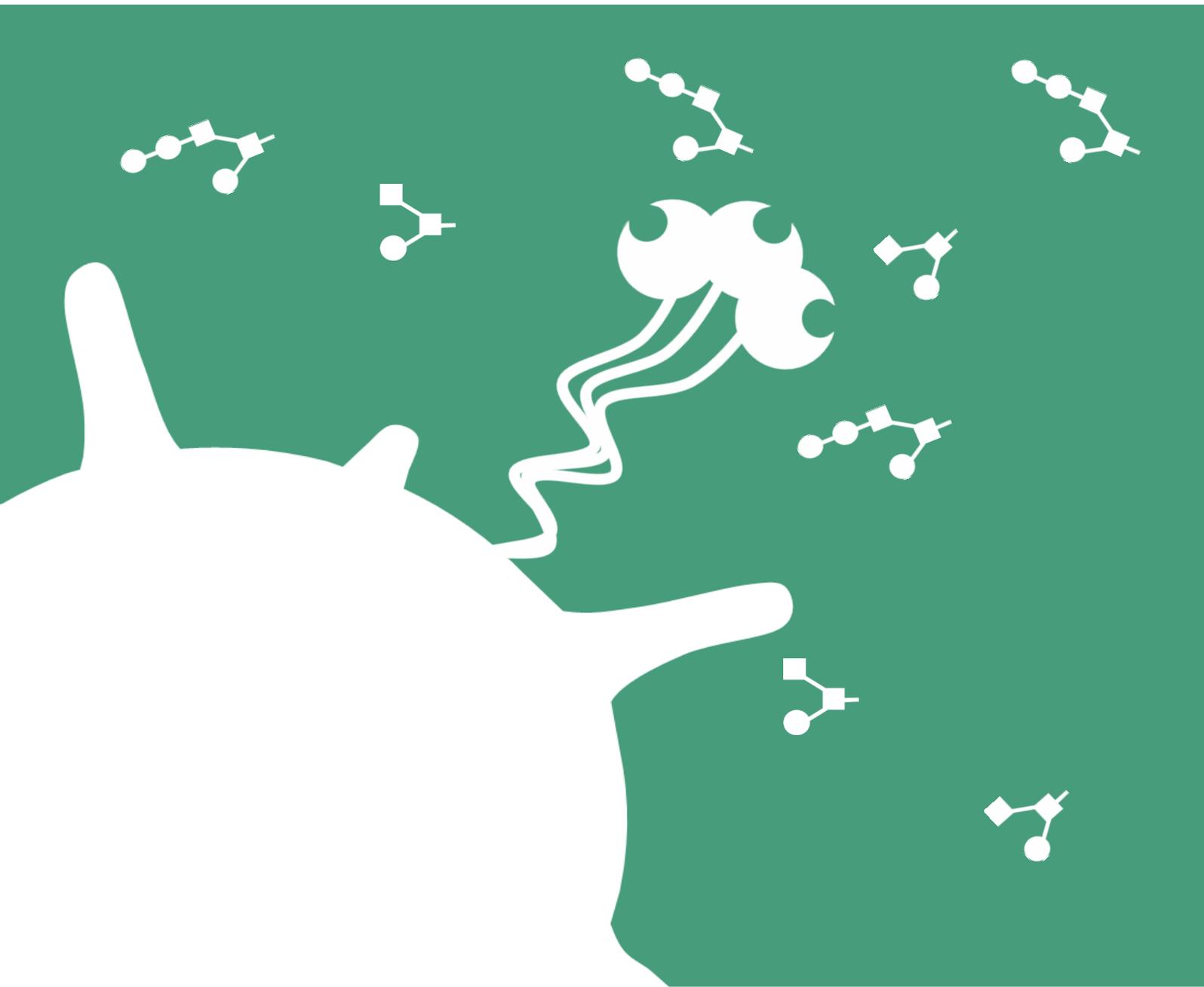
Tesis de Doctorado

Estudios sobre la interacción *in vivo* entre los glicanos de la capa laminar de *Echinococcus granulosus* y el receptor lectina Clec4F



MSc. Anabella Barrios
Tutor: Álvaro Díaz
Co-tutora: Cecilia Casaravilla

PEDECIBA Biología,
Biología Celular y Molecular



El trabajo de tesis que se describe a continuación, y que se titula “*Estudios sobre la interacción in vivo entre los glicanos de la capa laminar de Echinococcus granulosus y el receptor lectina Clec4F*”, se realizó para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de la República (UdelaR).

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología, perteneciente a Facultad de Ciencias y Facultad de Química de la UdelaR. La dirección de esta tesis estuvo a cargo del Dr. Álvaro Díaz (Prof. Titular de Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química) y la co-dirección de la Dra. Cecilia Casaravilla (Prof. Adjunta de Inmunología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias).

Para su realización se recibió el apoyo financiero de la Comisión Académica de Posgrado (CAP, beca de doctorado y beca de finalización de doctorado). El trabajo experimental se llevó a cabo mediante financiación de la Comisión Sectorial de Investigación Científica con el proyecto CSIC I+D (N° 558), la financiación de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación con el proyecto ANII-FCE (N° 136130), y de la alícuota de doctorado del PEDECIBA.

Y finalmente llegó... y hay mucha gente a la que agradecer.

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores, quienes han sido fundamentales en mi formación como investigadora. Muchas gracias Álvaro por aceptarme en tu grupo de trabajo hace ya 11 años. Sos un gran líder de equipo, muy exigente pero súper comprometido con nuestro trabajo, siempre presente, discutiendo ideas, aportando muchas más, he aprendido (y seguiré aprendiendo) muchísimo trabajando con vos. Muchas gracias Ceci! No sé por dónde empezar a agradecer, creo que debería tener una sección solo para vos... Gracias por escribirme aquel enero del 2013, eso llevó a que hoy esté en Inmuno. En estos años he aprendido muchísimo contigo, tanto del trabajo en la mesada como de docencia. Pero más allá de lo laboral, has sido un apoyo incondicional en lo personal y más aún durante los tiempos más difíciles. Gracias por darme un hogar y por compartir a Rafa conmigo, ustedes hicieron que todo fuera mucho más fácil, lindo y divertido. En fin, gracias a ambos, Álvaro y Ceci los admiro muchísimo.

Agradezco a aquellos que también hicieron posible el desarrollo de mi Doctorado, Steve Jenkins, Gustavo Salinas, Thomas Barth, Gualberto González, Diego Pérez y a Carlos ("nuestro" estadístico de confianza).

Muchas gracias todos los integrantes de la Cátedra de Inmunología, pero muy especialmente a la querida "casita del medio" y miembros "ex casita del medio". En esta "casita" no solo encontré excelentes profesionales, sino también grandes amigos! Quienes me han apoyado a lo largo de todos estos años y hacen que el lugar de trabajo sea un lugar cálido y divertido, al que uno siempre quiere volver. Muchas gracias Leti, Maite, Sofi, Vale, Anita y Mari por bancar mis catarsis y acompañarme en las buenas y en las malas. Gracias Cami por compartir las horas conmigo y Clec4F! Gracias a Nacho, quien me dijo una vez, luego de escucharme quejarme porque nada de lo experimental que estaba haciendo daba resultados, "es que a vos Ana desde que yo entré no te sale nada..." Pues se ve que algo salió! ;)

Muy especialmente quiero agradecer a mi padre y a mis hermanas, los amo, son todo para mí. Gracias Guz por ser un gran apoyo! Gracias también a mis amigas no científicas. Terminé! Los puedo ver más ahora!

Finalmente, muchas gracias a esas personas especiales que ya no están en mi vida pero que me acompañaron durante tanto tiempo en este proceso de formación. En especial, muchas gracias ma! Sos mi ejemplo de motorcito para siempre ir para adelante!

Índice

Resumen.....	7
Lista de abreviaturas.....	10
1 Introducción.....	14
1.1 Generalidades de las respuestas inmunes contra helmintos.....	14
1.2 <i>Echinococcus granulosus</i>	17
1.2.1 Ciclo de vida de <i>Echinococcus sp.</i>	18
1.2.2 Equinococosis quística.....	20
1.2.3 Hidátide.....	21
1.2.4 Capa Laminar.....	22
1.2.5 Respuesta inmune frente a la larva de <i>E. granulosus s.l.</i>	28
1.2.6 La capa laminar y la respuesta inmune.....	30
1.3 Generalidades de lectinas tipo C.....	35
1.3.1 Clec4F.....	35
1.4 Hígado.....	39
1.4.1 Estructura del hígado.....	40
1.4.2 Células de Kupffer (KC).....	44
1.4.3 Capacidad endocítica de las células del hígado.....	44
1.4.4 Respuestas inmunes montadas en hígado.....	46
1.5 Hipótesis de trabajo de esta Tesis.....	49
2 Objetivos.....	50
2.1 Objetivo general:.....	50
2.2 Objetivos Específicos:.....	50
3 Materiales y Métodos.....	51
3.1 Materiales de trabajo.....	51
3.1.1 Material parasitario.....	51
3.1.2 Validación de sondas empleadas para la detección de materiales de la LL por citometría de flujo.....	54
3.1.3 Modelos animales empleados.....	55
3.1.4 Mantenimiento de líneas celulares.....	57
3.1.5 Preparación de reactivos para la producción de partículas lentivirales (LV).....	57
3.2 Experimentos <i>in vitro</i>	64
3.2.1 Transducción de cultivos celulares para expresión estable de Clec4F.....	64
3.3 Experimentos <i>in vivo</i>	66
3.3.1 Inyección de materiales de la LL.....	66
3.3.2 Modelo de infección experimental secundaria con <i>E. granulosus</i>	67

3.3.3	Procesamiento de los tejidos colectados de los experimentos <i>in vivo</i>	68
3.4	Técnicas de análisis	70
3.4.1	Determinación del radio hidrodinámico de las preparaciones de sLL por análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS)	70
3.4.2	Evaluación de la oxidación los residuos monosacarídicos terminales de la LL y de la incorporación de biotina por <i>dot blot</i>	70
3.4.3	Evaluación de la expresión de Clec4F por <i>western blot</i>	71
3.4.4	Citometría de Flujo para análisis de la FNPH y de las células de la cavidad peritoneal, o de cultivos de líneas celulares modificados para expresión de Clec4F o GFP.	72
3.4.5	Cuantificación de citoquinas en solución mediante ELISA.....	74
3.4.6	Estudio de la especificidad de Clec4F por motivos glucídicos de la LL de <i>E. granulosus</i> mediante ELISA de competencia	76
3.4.7	Procesamiento de tejidos para análisis por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	76
3.5	Procesamiento de datos.....	78
3.5.1	Cuantificación de la carga parasitaria	78
3.5.2	Estimación de la contribución de los tipos celulares de la FNPH a la captación de materiales de la LL.....	78
3.6	Análisis estadístico	79
4	Resultados	80
4.1	Capítulo 1:	80
	Generación de líneas de macrófagos de ratón que expresan Clec4F.	80
4.2	Capítulo 2:	87
	Estudio de la captación de materiales de la LL exógenos por el hígado.....	87
4.2.1	Consideraciones generales y herramientas utilizadas	87
4.2.2	Validación de métodos para la detección de materiales de la LL	88
4.2.3	Estudio de la captación de mucinas de la LL solubles por las células presentes en la FNPH.	93
4.2.4	Estudio de la captación de materiales de la LL inyectados en formato particulado por parte de las células presentes en el hígado.	106
4.2.5	Estudio preliminar de los posibles cambios en las células de la FNPH asociados con la internalización de materiales de la LL.....	120
4.3	Capítulo 3:	127
	Estudio del papel de Clec4F en la captación de materiales de la LL y en la respuesta inmune durante la equinocosis quística experimental.	127
4.3.1	Estudio de la biodistribución y captación por las células del hígado de materiales de la LL liberados en el contexto de equinocosis quística secundaria experimental intraperitoneal.	127

4.3.2	Estudio preliminar del papel de Clec4F en la respuesta inmune en la equinococosis quística experimental.	138
5	Discusión	153
5.1	Intentos de obtención de un modelo <i>in vitro</i> de macrófagos que expresen Clec4F	153
5.2	Estudios de la interacción de Clec4F con las mucinas de la LL de <i>E. granulosus</i>	155
5.2.1	Evaluación de la captación materiales de la LL exógenos por las células del hígado y de la biodistribución de los mismos.	155
5.2.2	Estudio del papel de Clec4F en la captación de materiales de la LL durante la equinococosis quística experimental.	160
5.2.3	Capacidad endocítica de Clec4F	163
5.2.4	Posibles receptores involucrados en los mecanismos de captación de materiales de la LL independientes de Clec4F	164
5.2.5	Estudio de los posibles efectos de la ligación de Clec4F sobre las respuestas inmunes.....	165
6	Conclusiones.....	180
7	Bibliografía	181

Resumen

Echinococcus granulosus sensu lato agrupa a las especies de parásitos helmintos responsables de causar hidatidosis. Su estadio larvario, hidátide, se aloja en órganos internos, más comúnmente el hígado, de los hospederos intermediarios (mamíferos ungulados y accidentalmente el ser humano). Esta larva posee una estructura vesicular delimitada por dos capas: la capa germinativa, interna y de naturaleza celular, y la capa laminar (LL, del inglés *laminated layer*), externa, de naturaleza acelular, y compuesta principalmente por mucinas altamente *O*-glicosiladas. La hidátide puede alcanzar decenas de cm de diámetro, sin generar una inflamación acorde. Para poder crecer, el parásito libera al medio interno abundantes materiales de la LL. Evidencias obtenidas en experimentos *in vitro* mostraron que, de un importante panel de receptores innatos recombinantes, solo Clec4F se unió a las mucinas de la LL. Clec4F es una lectina de tipo C cuya expresión está restringida, en ratón, a los macrófagos residentes del hígado, las células de Kupffer (KC). El objetivo general de la presente Tesis fue investigar la interacción de las mucinas de la LL con Clec4F nativo, y evaluar los efectos *in vivo* de dicha interacción. Para esto, se trabajó con ratones WT o genéticamente deficientes en Clec4F (*Clec4f*^{-/-}), a los cuales se inyectó material solubilizado o particulado de la LL (pLL). Además, se infectaron ratones con protoscoíces de *E. granulosus (sensu stricto)* intraperitonealmente, y se dejó desarrollar las infecciones. Se analizó la fracción no parenquimal del hígado por citometría de flujo, y varios órganos, incluyendo el hígado, por inmunohistoquímica, para detectar la presencia de materiales de la LL. Tanto luego de la inyección de materiales exógenos de la LL como en el contexto de la infección experimental, se observó que las mucinas de la LL circulan en forma sistémica y se concentran en las KC, en forma mayoritariamente dependiente de la integridad de sus glicanos y de Clec4F. Los datos obtenidos a partir de la inyección de pLL mostraron que en ausencia de Clec4F hay captación compensatoria por órganos linfoides secundarios. En el contexto de la infección crónica experimental, la ausencia de Clec4F no afectó los parámetros de reclutamiento y fenotipo de células innatas evaluados en el sitio de la infección, ni la respuesta específica de antígeno de los linfocitos T de bazo. Sin embargo, en ratones WT infectados se detectó un aumento en la expresión de PD-L1 en KC que

estuvo ausente en ratones *Clec4f^{-/-}*, además estos ratones mostraron una tendencia hacia mayores cargas parasitarias en comparación con los animales *Clec4f^{-/-}*.

Así, se puede plantear que las KC, gracias a su expresión de Clec4F, actúan como un sumidero de los materiales de la LL liberados en la infección. Las KC son células basalmente anti-inflamatorias y tolerogénicas, en las que la expresión de la molécula co-inhibitoria PD-L1 se potencia cuando interaccionan en forma específica de antígeno con linfocitos T CD4⁺. Dado que ancestralmente las larvas de *Echinococcus* se alojaban en el hígado de roedores, la interacción Clec4F-LL podría haber surgido como un mecanismo de evasión parasitaria, en el cual se dirigirían antígenos parasitarios a presentación tolerogénica por KC. Una respuesta tolerogénica a la infección dependiente de KC y Clec4F podría, en parte, explicar la tendencia hacia menores cargas parasitarias en los animales *Clec4f^{-/-}* en comparación con los WT. La no detección de diferencias en respuesta local y sistémica entre ratones WT y *Clec4f^{-/-}* infectados podría deberse a que tales diferencias se expresarían solo en etapas relativamente tempranas de infección, desapareciendo en la infección avanzada, en la medida que cobran fuerza mecanismos de captación de materiales de LL por KC independientes de Clec4F.

Finalmente, los datos de esta tesis aportan pistas sobre la hidatidosis en hospederos naturales. Datos transcriptómicos sugieren que en bovinos el receptor es expresado, además de en el hígado, en órganos linfoides secundarios. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis la captación de materiales de LL por KC en bovinos y seguramente otros rumiantes, probablemente tiene lugar tanto cuando el parásito se aloja en el hígado como cuando lo hace en sitios extra-hepáticos. En cuanto al ser humano, que no expresa Clec4F funcional como lectina, parece probable que la acumulación de materiales de LL en órganos linfoides sea dominante en relación a la captación por KC, en forma similar a lo observado en ratones *Clec4f^{-/-}*.

Lista de abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa I	enzima deoxirribonucleasa I
AOPI	tinción naranja de acridina/ioduro de propidio, del inglés <i>Acridine Orange/Propidium Iodine stain</i>
APC	célula presentadora de antígeno, del inglés <i>Antigen Presenting Cell</i>
APC	aloficocianina
APC-Cy7	conjugado en tándem de APC y cianina 7
ARN	ácido ribonucleico
ASGR	receptor de asialoglicoproteínas, del inglés <i>ASialoGlycoprotein Receptor</i>
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
Breg	linfocitos B reguladores
BSA	seroalbúmina bovina, inglés <i>bovine serum albumin</i>)
BV	violeta brillante, del inglés <i>brilliant violet</i>
CD	célula dendrítica
CD11b	cluster de diferenciación 11b, marcador fenotípico de células mieloides de la inmunidad innata
CD206	cluster de diferenciación 206, receptor de manosa
CD31	cluster de diferenciación 31, marcador fenotípico de LSEC
CD36	cluster de diferenciación 36, receptor barrendero
CD40	cluster de diferenciación 40, molécula co-estimuladora
CD45	cluster de diferenciación 45, marcador de células hematopoyéticas
CD86	cluster de diferenciación 86, molécula co-estimuladora
CE	equinococosis quística, del inglés <i>cystic echinococosis</i>
CHEA	Comisión Honoraria de Experimentación Animal
CLEC2	receptor lectina tipo C 2, del inglés <i>C-type lectin-like receptor 2</i>
Clec4F	receptor lectina tipo C 4F, del inglés <i>C-type lectin domain family 4</i>
<i>Clec4f^{-/-}</i>	deficiente en Clec4F
CLR	receptores lectina de tipo C, del inglés <i>C-type Lectin Receptors</i>
CR2	receptor de complemento 2, del inglés <i>complement receptor 2</i>

CRIg	receptor de complemento de la familia de las inmunoglobulinas, del inglés <i>Complement Receptor of the ImmunoGlobulin family</i>
CRISPR-Cas9	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas asociadas a la proteína 9, del inglés <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Associated to protein 9</i>
CTLD	dominios globulares similares a lectina tipo C, del inglés <i>C-type lectin-like domain</i>
Cy3	cianina 3
DAPI	4'6-diamidino-2-fenilindol
DLS	dispersión dinámica de la luz, del inglés <i>dynamic light scattering</i>
DMEM	medio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	ditiotreitól
E492	anticuerpo monoclonal de ratón anti-LL
EDTA	ácido etilendiaminotetra-acético, del inglés, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	Ácido etilenbis oxietilennitrilo)-tetra acético, del inglés, <i>ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ELISA	enzimoinmunoensayo, del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
F4/80	marcador fenotípico de macrófagos, del inglés <i>Adhesion G protein-coupled receptor E4</i>
FC	citometría de flujo, del inglés <i>flow cytometry</i>
Fc	región constante de inmunoglobulinas
FDC	célula dendrítica folicular, del inglés <i>Follicular Dendritic Cell</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FNPH	fracción no parenquimal hepática
FSC	dispersión frontal, del inglés <i>forward side scatter</i>
Fuc	fucosa
Gal	galactosa
GalNac	N-acetil galactosamina
GFP	proteína fluorescente verde, del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>
GL	capa germinativa, del inglés <i>germinal layer</i>
GlcNac	N-acetil glucosamina
Glu	ácido glutámico
GPI	glicosilfosfatodil-inositol, del inglés <i>glycophosphatidyl inositol</i>)
HEK 293T	línea celular epitelial humana

HIV-1	virus de la inmunodeficiencia humana 1, del inglés <i>Human Immunodeficiency Virus 1</i>
HRP	peroxidasa de rábano, del inglés <i>Horse Raddish Peroxidase</i>
i.p.	inyección intraperitoneal
i.v.	inyección intravenosa
IDO	indol-amina 2,3-dioxigenasa
IFN- γ	interferón gama
IgG/IgM/IgE/IgA	inmunoglobulina G, M, E o A
IL	interleuquina
ILC	células linfoides innatas, del inglés <i>Innate Lymphoid Cells</i>
InsP ₆ .Ca	<i>myo</i> -inositol hehakisfosfato cálcico
J774A.1	línea celular de macrófagos de ratón
KC	célula de Kupffer, del inglés <i>Kupffer Cell</i>
LB	medio Luria Bertani
LB	linfocito B
LBZM	linfocito B de la zona marginal
LDL	lipoproteína de baja densidad, del inglés <i>low density lipoprotein</i>
LH	líquido hidático
LL	capa laminar, del inglés <i>laminated layer</i>
LPM	macrófagos grandes peritoneales, del inglés <i>Large Peritoneal Macrophages</i>
LPS	lipopolisacárido
LSEC	célula del endotelio sinusoidal hepático, del inglés <i>Liver Endothelial Sinusoidal Cell</i>
LV	lentivirus
Ly6C	marcador fenotípico de monocitos, del inglés <i>Lymphocyte antigen 6 Complex, locus C</i>
M(IL-4)	macrófagos alternativamente activados por IL-4
M1	macrófago clasicamente activado
MAIT	células T invariantes asociadas a mucosas, del inglés <i>mucosal associated invariant T cell</i>
MARCO	del inglés, <i>MAcrophage Receptor with COLlagenous structure</i>
MATS	señalización disparada por afinidad a membranas, del inglés <i>Membrane Affinity Triggered Signaling</i>

M-CSF	factor estimulante de colonia de macrófagos, del inglés <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MFI	promedio de intensidad de fluorescencia, del inglés <i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MFO	fluorescencia menos uno, del inglés <i>Fluorescencia Menos Uno</i>
MGL	lectina de macrófago de unión a galactosa, del inglés <i>Macrophage Galactose Lectin</i>
MHC-I/II	molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I/II, del inglés Major Histocompatibility Complex I/II
N2	Neutrófilos con fenotipo de activación alternativa
NET	trampas extracelulares de neutrófilos, del inglés <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF-kB	factor nuclear, del inglés <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHS-biotina	N-Hidroxisuccinimida-Biotina
NKT	células T asesinas naturales, del inglés <i>Natural Killer T cell</i>
NOD	dominio nucleotídico de oligomerización, del inglés <i>Nucleotide Oligomerization Domain</i>
O/N	toda la noche, del inglés <i>over night</i>
p.i.	post-infección
PAMP	patron molecular asociado a patógenos, del inglés <i>Pathogen Associated Molecular Patern</i>
PBS	tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1	muerte programada 1, del inglés <i>Programmed Death 1</i>
PD-L1	ligando de muerte programada 1, del inglés <i>Programmed Death Ligand 1</i>
PD-L2	ligando de muerte programada 2, del inglés <i>Programmed Death Ligand 2</i>
PE	ficoeritrina
PE-Cy7	conjugado en tándem de PE y la cianina 7
PEI	polietilenimina
PerCP-Cy5	conjugado en tándem de proteínas peridinina clorofila y cianina 5
PFA	paraformaldehído
PGE-2	prostaglandina E2
pLL	material de la LL particulado
PNA	lectina aglutinante del maní, del inglés <i>PeaNut Agglutinin lectin</i>

Pro	prolina
PSC	protoscolex
PVDF	fluoruro de polivinilideno, del inglés <i>PolyVinylidene Fluoride</i>
RAW 264.7	línea celular de macrófagos de ratón
RIG-I	gen inducible por ácido retinoico I, del inglés <i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RPMI	medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida empleando SDS, del inglés, <i>SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
Ser	serina
SFB	suero fetal bovino
sLL	material de LL solubilizado
sLL-BH ₄	material de LL solubilizado control
sLL-IO ₄	material de LL solubilizado con glicanos oxidados
SPM	macrófagos pequeños peritoneales, del inglés <i>Small Peritoneal Macrophages</i>
SR-A	<i>Scavenger Receptor A</i>
SSC	dispersión lateral, del inglés <i>side side scatter</i>
STING	Estimulador de genes de interferon, del inglés <i>Stimulator of Interferon Genes</i>
TBS	tampón tris salino, (del inglés <i>Tris Buffer Saline</i>
TCR	receptor de linfocito T, del inglés <i>T Cell Receptor</i>
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta, del inglés <i>Transforming growth Factor beta</i>
Th1/Th2/Th17	células T colaboradoras de tipo 1, 2 o 17, del inglés <i>T helper (1, 2 o 17)</i>
Thr	treonina
TLR	receptor tipo Toll, del inglés <i>Toll Like Receptor</i>
TMB	tetrametilbencidina
Treg	linfocitos T reguladores
VC	vía clásica del complemento
VSV-G	proteína G del virus de estomatitis vesicular, del inglés <i>Vesicular Stomatitis Virus G protein</i>
VSV-G-LV	partícula lentiviral pseudotipada por VSV-G
wpLL	material de LL particulado conteniendo gránulos de InsP ₆ .Ca
WT	tipo silvestre, del inglés <i>Wild Type</i>

1 Introducción

1.1 Generalidades de las respuestas inmunes contra helmintos

El término helminto es actualmente usado como sinónimo de gusano parásito. Los helmintos son organismos multicelulares, que pertenecen a grupos filogenéticamente divergentes (platelmintos, nematodos, acantocéfalos y pentastómidos). Se estima que cerca de 2 billones de individuos en el mundo sufren de infecciones causadas por este tipo de parásitos¹. Estos organismos son capaces de establecer infecciones crónicas de larga duración, y a pesar de alcanzar tamaños del orden de los centímetros, en la mayoría de los casos, las infecciones que producen son asintomáticas y pueden pasar años inadvertidas por el sistema inmune de los hospederos. Cuando las infecciones se hacen sintomáticas, se asocian a índices altos de morbilidad/mortalidad, en particular en países en vías de desarrollo¹.

A pesar de la heterogeneidad que existe dentro de los helmintos, desde el punto de vista inmunológico, estos organismos tienen en común la inducción de respuestas inmunes de tipo 2^{2,3}. Las respuestas de tipo 2 promueven la activación de células tanto inmunes como no inmunes, que conducen no solo a mecanismos efectores capaces de dañar/encapsular y a veces eliminar a los helmintos, sino también a la reparación de los tejidos dañados por la migración y/o establecimiento de estos^{3,4}. En ese tipo de respuesta, la activación de células epiteliales, células dendríticas, macrófagos, mastocitos, linfocitos innatos productores (ILC, del inglés *Innate Lymphoid Cells*), basófilos y eosinófilos lleva eventualmente a la activación y condicionamiento de linfocitos T a un perfil Th2, lo cual a su vez potencia los mecanismos efectores de las respuestas innatas. Además, en humanos, las respuestas de tipo 2 llevan a la activación de linfocitos B productores de IgE e IgG4^{5,6}.

Las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) son las principales inductoras de los mecanismos efectores típicos de las respuestas tipo 2, los cuales varían dependiendo del nicho donde se aloje el parásito². En la mucosa intestinal, las células epiteliales del intestino responden a la IL-4 e IL-13 promoviendo la diferenciación de células

productoras de mucus (células caliciformes) y la producción de la citoquina anti-helmíntica Relm- β , la cual interfiere con la ingesta de nutrientes por parte de los parásitos⁷. Además, la IL-4 promueve la contracción muscular y el recambio de células epiteliales, ambos mecanismos cruciales para la expulsión de parásitos intestinales. En la misma línea, la IL-9 promueve la proliferación de mastocitos que secretan proteasas capaces de romper las uniones epiteliales estrechas favoreciendo así el “barrido” de parásitos debido al pasaje de fluido desde el medio interno hacia la luz del intestino⁸. Con respecto a los tejidos no mucosos, los eosinófilos eran considerados hasta hace poco células clave en la respuesta anti-helmíntica. Sin embargo, a pesar de participar en estas respuestas, no serían las principales células innatas en hacerlo, y tendrían un papel más asociado a la promoción de la reparación tisular y secreción de citoquinas de tipo 2 (como IL-4), más que en la participación directa sobre el control de estos parásitos^{9,10}. Por su parte, los basófilos y las ILC2 también contribuyen a la producción innata de IL-4¹¹. La presencia de IL-4 en el sitio de infección promueve la diferenciación y proliferación de macrófagos con fenotipo M2 o M(IL-4)¹². Los macrófagos M(IL-4) cumplen un papel fundamental en la reparación de tejidos, así como en la respuesta anti-helmíntica. Se caracterizan por expresar altos niveles de la enzima arginasa-1, y de los mediadores solubles secretados ChiL-3 (o Ym1) y RELM- α ^{2,13}. Si bien las funciones de RELM- α y de Ym-1 no se comprenden completamente, se las ha asociado con la reparación tisular². Por su parte, la activación de arginasa-1 inhibe la activación y proliferación de los linfocitos T al inhibir la expresión de la cadena ζ del co-receptor CD3 del receptor de los linfocitos T (TCR), a través del consumo de L-arginina^{14,15}. Por otro lado, los productos del catabolismo de L-arginina (L-ornitina y otras poliaminas) disminuyen la movilidad de las larvas, promoviendo así la expulsión de las mismas de los tejidos¹⁶.

Interesantemente, en los últimos años se ha evidenciado el papel de los neutrófilos, células clásicamente asociadas a las respuestas de tipo 1 que se montan contra bacterias extracelulares y levaduras, en las respuestas contra helmintos¹⁷. Tras su activación, los neutrófilos vuelcan su material genético en estructuras que forman redes extracelulares (NETs, del inglés *Neutrophil Extracellular Traps*) sobre las larvas mientras migran por los tejidos, impidiendo el avance de las mismas¹⁸. Estas NETs poseen además componentes

tóxicos (enzimas y especies reactivas del oxígeno) que actúan sobre la superficie del helminto dañándolo. Además, se ha demostrado que durante las infecciones por helmintos, los neutrófilos pueden expresar arginasa-1 e IL-13, adquiriendo un fenotipo denominado N2¹⁹. A través de la producción de IL-13, estos neutrófilos N2 promueven la activación de macrófagos M(IL-4). Además, también inducen la expresión de moléculas de adhesión en los macrófagos M(IL-4), lo que permite la adhesión de estos últimos a la superficie de los parásitos, inhibiendo funciones quimiosensoriales así como de acceso a nutrientes, repercutiendo por lo tanto en la sobrevivencia del parásito¹⁹.

En la mayoría de los casos, los helmintos logran establecer infecciones crónicas que coexisten con una respuesta Th2 que resulta inefectiva. Se ha visto que las respuestas inmunes anti-helmínticas se caracterizan por la presencia de componentes reguladores superpuestos a la respuesta Th2. La situación en la que se superponen una respuesta efectora polarizada Th2 y una respuesta reguladora se describe como “respuesta Th2 modificada”^{20,21}. Generalmente, la respuesta reguladora involucra la activación de componentes supresores del sistema inmune, como son los linfocitos T reguladores (Treg), linfocitos B reguladores (Breg) y/o células mieloides supresoras (MDSC, del inglés *myeloid-derived suppressor cells*). También se ha observado aumento en la expresión de moléculas inhibitorias en macrófagos M(IL-4), como ser la expresión de IL-10 y de los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2²²⁻²⁴. Estos componentes se imponen sobre la respuesta Th2 efectora, lo que determina que se produzcan menores niveles de IL-5 e IL-13 por la misma, y en cambio mayores niveles de IL-10 y TGF- β por la respuesta reguladora.

Así, mientras que la respuesta Th2 es una respuesta del sistema inmune del hospedero al reconocimiento de los helmintos, la respuesta reguladora que se monta en estas infecciones parece responder a mecanismos de adaptación de estos parásitos a sus hospederos, lo que permite que sean tolerados y se establezcan crónicamente^{20,21}.

En varias situaciones, la supresión de las respuestas efectoras inducidas por los helmintos puede hacerse general y atenuar también respuestas a otros antígenos/patógenos no relacionados. Se ha observado que la activación de respuestas reguladoras durante las infecciones por helmintos protege a los hospederos de

respuestas exacerbadas durante las reacciones de alergias o de respuestas autoinmunes⁴. Esto llevó a la reformulación de la hipótesis de la higiene, que en su versión actual relaciona el aumento en la prevalencia de las enfermedades alérgicas y autoinmunes en los países desarrollados con la disminución en la prevalencia de las infecciones por helmintos. Se postula que el estilo de vida actual (higiene personal, desarrollo de vacunas, etc), y por lo tanto una disminución de la tasa de infecciones por helmintos y otros patógenos capaces de ejercer inmunoregulación, ha conducido a la disminución de estímulos ambientales inmuno-reguladores, aumentando consecuentemente la incidencia de respuestas inmunes exacerbadas²⁵.

1.2 *Echinococcus granulosus*

El género *Echinococcus*, perteneciente al filo platelmintos, a la clase cestoda y a la familia *Taeniidae*, agrupa a endoparásitos obligados con ciclos de vida que requieren de dos hospedadores. Actualmente se reconocen en el género nueve especies: *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *E. oligarthra*, *E. granulosus sensu stricto (s.s.)*, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. shiquicus* y *E. felidis*. Esta clasificación se basa en análisis taxonómicos moleculares, que comparan secuencias de ADN mitocondrial y nuclear, y permitió reconocer varios genotipos que antes se agrupaban dentro de la especie *E. granulosus*. Los genotipos G1-G2 y G3 (también llamados cepas de oveja y de búfalo, respectivamente), corresponden ahora a la especie *E. granulosus (s.s.)*. De manera similar, los genotipos G4, G5, y G6-G10 corresponden en la clasificación actual a *E. equinus*, *E. ortleppi* y *E. canadensis*, respectivamente²⁶. Este conjunto de especies (G1-G10) surgido de la antigua especie *E. granulosus* se denomina ahora *E. granulosus sensu lato (s.l.)*. En todas las especies del género, carnívoros (cánidos o félidos) actúan como hospederos definitivos (o sea alojan la forma adulta del gusano), mientras que herbívoros (roedores, lagomorfos y ungulados) actúan como hospederos intermediarios (o sea albergan a la larva, también llamada metacestodo). Cada especie tiene preferencias de hospedero definitivo y/o intermediario (Tabla 1.1).

Especie (Genotipo)	Hospedero definitivo	Hospedero intermediario	Distribución
<i>E. granulosus s.s</i> (G1-G3)	Perro, lobo, chacal y otros cánidos	Oveja, cabra, vacas, cerdos, camello, búfalo, caballo, ungulados salvajes, marsupiales, etc	Cosmopolita
<i>E. equinus</i> (G4)	Perro	Caballo, otros équidos y cérvidos	Eurasia y África
<i>E. ortleppi</i> (G5)	Perro	Vaca	Eurasia y África
<i>E. canadensis</i> (G6-G10)	Perro, lobo	Cerdo, camello y cérvidos	Eurasia, África, Norte y Sudamérica

Tabla 1.1. Distribución geográfica y hospederos preferenciales de las especies comprendidas en el grupo *E. granulosus s.l.*. Datos tomados de Nakao *et. al* 2013 ²⁶.

La infección por las formas larvianas de las especies agrupadas como *E. granulosus s.l.* se denomina hidatidosis o equinococosis quística. Esta enfermedad zoonótica es relevante en países con fuerte actividad ganadera como son Argentina y Uruguay. Para estos países, datos de secuenciación evidenciaron que la mayoría de las infecciones de ganado y el 80 % de los casos de infecciones en humanos son causadas por *E. granulosus s.s* ²⁷.

1.2.1 Ciclo de vida de *Echinococcus sp.*

E. granulosus s.l. presenta un ciclo de vida complejo que requiere de dos hospederos para completarse (Figura 1.1). Brevemente, el estadio adulto se aloja en el intestino delgado de los hospederos definitivos (generalmente perros, zorros u otros cánidos), donde se reproduce y libera al ambiente huevos embrionados a través de las heces. Los hospedadores intermediarios (ungulados, principalmente ovinos, bovinos, suinos y equinos, y también, accidentalmente, el ser humano) ingieren estos huevos que, una vez en el intestino delgado, eclosionan liberando oncosferas. Las oncosferas penetran la pared intestinal y son llevadas por el sistema circulatorio al parénquima de órganos internos, principalmente hígado y pulmón. Una vez allí se desarrollan a larvas llamadas hidátides, que a su vez producen protoscólices (PSC). El potencial reproductivo de la larva es muy alto, pudiendo llegar a formarse miles de PSC en una única hidátide. Además, los PSC presentan una sorprendente plasticidad en cuanto a su capacidad de diferenciación: si son ingeridos por el hospedero definitivo (en vísceras de hospedadores intermediarios infectados), se diferencian a adultos, pero si se liberan en el medio

interno de un hospedero intermediario, por ruptura de una hidátide, se desarrollan en forma reversa a nuevas hidátides, en un proceso llamado infección secundaria. En el hospedero definitivo, luego de ser ingeridos, los PSC evaginan y se adhieren a la mucosa intestinal, donde se desarrollan al estadio adulto en cuestión de 32-80 días. El ser humano, que se ve infectado principalmente al ingerir vegetales o aguas contaminadas, es un hospedador intermediario accidental, no contribuyendo al ciclo del parásito²⁸.

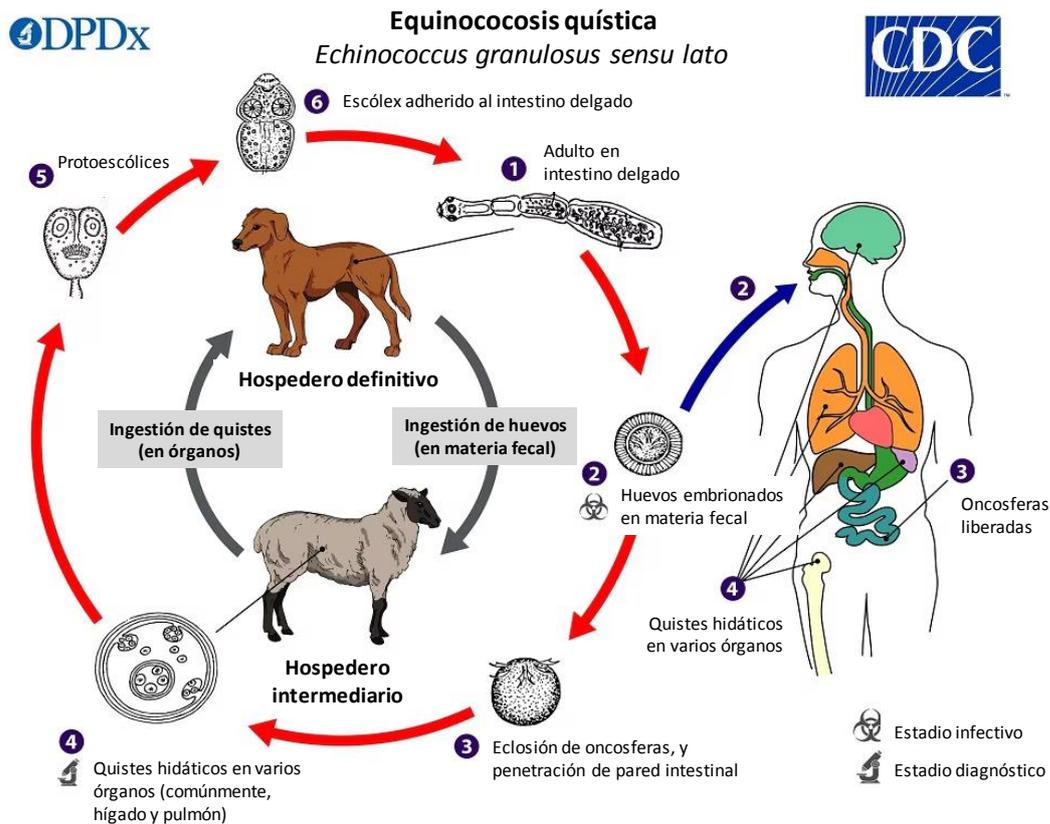


Figura 1.1. Ciclo de vida de *E. granulosus*. El estadio adulto de *E. granulosus s.l.* reside en el intestino delgado de los hospederos definitivos (cánidos) (1). La forma adulta libera huevos al medio a través de las heces del hospedero definitivo (2). Los hospederos intermediarios ingieren estos huevos, los cuales eclosionan en el intestino delgado y liberan a las oncosferas (3). Estas oncosferas penetran la pared intestinal y pueden migrar, a través del sistema circulatorio, a varios órganos, principalmente hígado y pulmón. En estos órganos, las oncosferas se desarrollan a hidátides, las que crecen lentamente, conteniendo en su interior PSC e hidátides hijas (4). El hospedero definitivo puede infectarse al ingerir órganos de hospederos intermediarios infectados, es decir conteniendo hidátides. Luego de la ingestión, los PSC (5) evaginan y se adhieren a la mucosa intestinal (6), en donde se desarrollan al estado adulto tras 32-80 días. Imagen tomada de: <https://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html>.

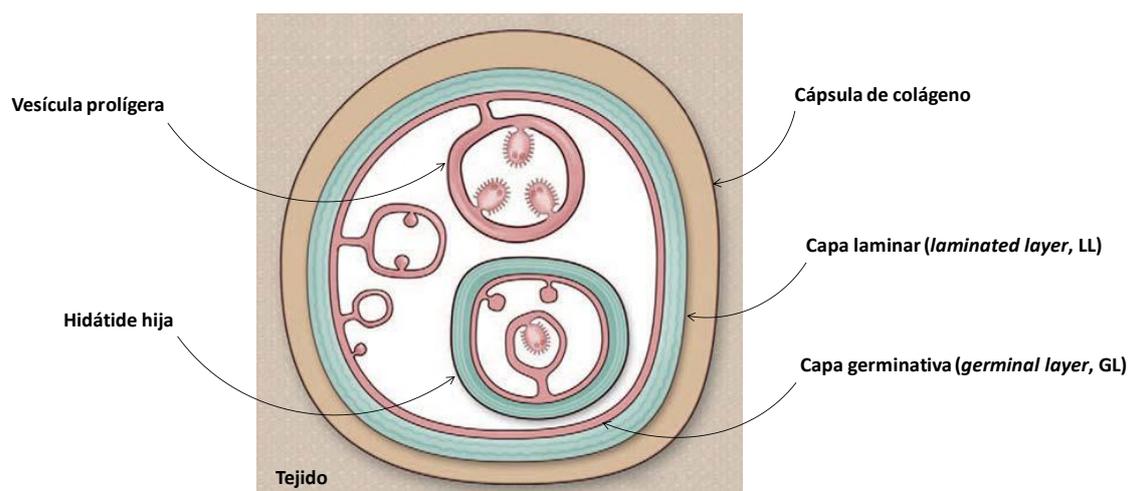
1.2.2 Equinococosis quística

La equinococosis quística (CE, del inglés *cystic echinococcosis*) o hidatidosis es una enfermedad tropical zoonótica desatendida y fuertemente asociada con la ganadería en contextos subdesarrollados^{29,30}. Se ha determinado que *E. granulosus* s.s. causa entre el 73 % y el 88 % de los casos de CE en humanos en todo el mundo^{27,31}, mientras que en segundo lugar se ubican los genotipos G6 y G7 de *E. canadensis*, que son responsables de entre el 11 % y el 21 % de los casos, respectivamente^{30,31}. Por otra parte, la CE tiene un fuerte impacto sobre la salud animal, provocando infecciones en el ganado que conllevan a grandes pérdidas económicas para los productores (menor rendimiento y valor de la carne y leche)³².

La hidátide se establece en el parénquima de los órganos internos del hospedero intermediario, siendo el sitio más común el hígado, seguido de los pulmones (aproximadamente 80 %, y 20 % de los casos, respectivamente)^{27,29,33}. En hospederos a los que el parásito está bien adaptado, la hidátide genera una infección crónica, pasando desapercibida por tiempos prolongados (muchos años), a pesar de que puede alcanzar un tamaño considerable (decenas de centímetros de diámetro). Esto se debe al lento crecimiento de la larva (de milímetros a decenas de milímetros por año³⁴ y a la excelente adaptación del parásito a su hospedero, reflejada en un fuerte control de la respuesta inflamatoria³⁵. A largo plazo la infección provoca fallas en los órganos por compresión debida al crecimiento de la hidátide. Existen además complicaciones como la ruptura de la hidátide y el derrame del contenido del mismo, lo que puede causar síntomas alérgicos, y llevar al choque anafiláctico³⁶, o promover el desarrollo de múltiples hidátides a partir de los PSC liberados, lo cual se asocia con mayor gravedad de la CE³³. A pesar del gran tamaño que puede adoptar la hidátide en los tejidos, la infección con *E. granulosus* es muchas veces asintomática, lo que hace difícil su diagnóstico. Esta aparente paradoja entre la falta de síntomas y la presencia de macroparásitos en el organismo es común a muchas infecciones con helmintos y evidencia la gran capacidad de evasión del sistema inmune de estos organismos³⁷.

1.2.3 Hidátide

La hidátide es una estructura parasitaria unilocular subesférica llena de líquido (líquido hidático, LH) y turgente, que puede alcanzar decenas de cm de diámetro. Está delimitada por una pared (Figura 1.2). Ésta a su vez se compone por una capa celular, la capa germinativa (del inglés, *germinal layer*, GL), y externa a ella, una capa de material extracelular, la capa laminar (del inglés, *laminated layer*, LL). La GL está formada por una capa fina de células que incluye, del lado externo, un sincitio. De esta capa brotan hacia el interior de la hidátide pequeñas vesículas que dan lugar a la formación de PSC. Por otro lado, las células de la GL son las encargadas de sintetizar y secretar los componentes de la LL. Por fuera de la LL se encuentra una cápsula de colágeno producida por el hospedador (capa adventicia) o una zona de reacción inflamatoria local activa con infiltración de leucocitos. El predominio de uno u otro tipo de reacción se relaciona con el grado de adaptación de la especie/genotipo del parásito a la especie de hospedador intermediario en cuestión; la formación de la cápsula de colágeno es un signo de buena adaptación parásito-hospedador, y por lo general correlaciona con el desarrollo de hidátides fértiles (es decir conteniendo PSC). En cambio, en los casos de una mala adaptación del parásito, se genera una zona de reacción inflamatoria activa y se producen hidátides no fértiles^{38,39}. En conjunto, la hidátide y la capa adventicia y/o reacción inflamatoria local conforman lo que se denomina quiste hidático.



Ver leyenda de la Figura 1.2 en la siguiente página.

Figura 1.2. Estructura del estadio larvario de *E. granulosus*. El estadio larvario de *E. granulosus* s.l., hidátide, es una estructura subesférica delimitada por una pared, compuesta por la capa germinativa (del inglés, *germinal layer*, GL) y la capa laminar (del inglés, *laminated layer*, LL). Por fuera de la pared suele haber una cápsula de colágeno (capa adventicia), que en conjunto con la hidátide en sí forma el quiste hidático. En los casos en los que no se resuelve la inflamación, la cápsula de colágeno está asociada a un infiltrado inflamatorio, lo cual es un signo de mala adaptación hospedero-parásito. El interior de la hidátide contiene el líquido hidático, que baña a las células de la GL. Éstas generan brotes hacia el interior de la hidátide, que se vesicularizan y forman protoscolices. Tomado y modificado de ⁷⁰.

1.2.4 Capa Laminar

La LL es una estructura única y distintiva del género *Echinococcus*, y constituye indudablemente un componente principal en la adaptación de estos parásitos a residir durante años a décadas en los órganos internos de mamíferos inmunocompetentes. La LL contribuye al mantenimiento de la integridad física de la hidátide y condiciona la interacción con el sistema inmune del hospedador. Como ya se mencionó, esta estructura acelular es sintetizada por las células de la GL subyacente, a las que protege del contacto directo con las células del sistema inmune del hospedador⁴⁰. Esta estructura en *E. granulosus* puede alcanzar los 3 mm de espesor, y es hidrofílica, elástica, y da sostén físico a la hidátide, permitiéndole estar turgente, y por lo tanto tolerar el desarrollo de una presión interna, por el crecimiento del propio metacestodo, y una externa, por la compresión con los tejidos, que podría conducir a la ruptura de la larva.

1.2.4.1 Estructura y bioquímica de la capa laminar

La LL es una estructura especializada que se asemeja a una matriz extracelular, y debe su nombre a laminaciones concéntricas que posee, observables al microscopio óptico, así como también al microscopio electrónico⁴⁰⁻⁴² (Figura 1.3a). A nivel molecular la LL se compone principalmente de una malla de glicoproteínas altamente *O*-glicosiladas (mucinas) y abundantes nano depósitos de una sal cálcica de *myo*-inositol hexakisfosfato. Las mucinas son el componente principal en las LL de todas las especies de *Echinococcus*, mientras que los depósitos de InsP_6 cálcico están presentes en *E. granulosus sensu stricto* y *E. equinus* (y probablemente también en las otras especies del complejo *E. granulosus sensu lato*), pero no en *E. multilocularis*⁴³. Estos dos grandes

componentes moleculares se corresponden a nivel ultraestructural con una red de fibrillas y con gránulos densos a los electrones, respectivamente (Figura 1.3b).

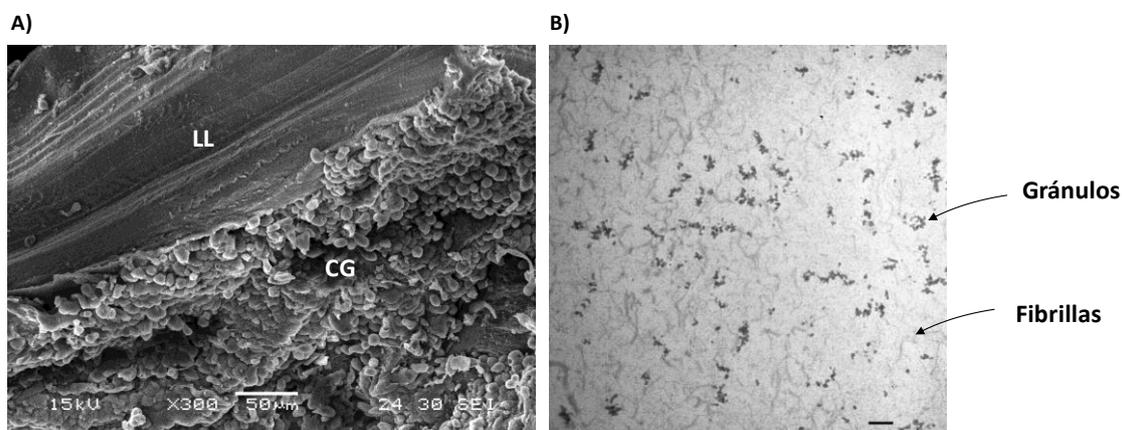


Figura 1.3. Ultraestructura de la capa laminar de *E. granulosus s.l.* En (A) se muestra una micrografía electrónica de barrido, en la que se puede apreciar a la GL y a las laminaciones presentes en la LL. En (B) se muestra una micrografía electrónica de transmisión, en la que se puede observar las fibrillas correspondientes a las mucinas y los gránulos densos a los electrones correspondientes a los depósitos de InsP_6 cálcico. La barra corresponde a $0,5 \mu\text{m}$. La micrografía mostrada en (A) fue amablemente cedida por María Celina Elisondo (CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina).

1.2.4.1.1 Mucinas

Generalmente las mucinas de origen animal forman estructuras no rígidas, altamente hidratadas y agregadas, como el mucus⁴⁴. Las mucinas de la LL también poseen un alto nivel de hidratación y forman estructuras de tipo gel⁴⁰, sin embargo, a diferencia del mucus, la malla de mucinas de la LL forma, como se dijo, una estructura con resistencia al estiramiento.

Como se mencionó previamente, las mucinas son el componente principal de la LL de todas las especies del género^{40,43,45}. Las secuencias de las apomucinas que constituyen a la LL de *E. granulosus* han sido deducidas a partir de datos de genómica y transcriptómica, pero las mismas aún no han sido confirmadas por proteómica^{40,46-48}. Estas secuencias, altamente expresadas en la GL pero ausentes en PSC, codifican principalmente para apomucinas de corta longitud que contienen un péptido líder (necesario para la secreción convencional de proteínas), un extremo N-terminal corto

no glicosilado, un dominio mucina con una alta densidad de O-glicosilación predicha, y una señal en el extremo C-terminal para la incorporación de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI)⁴⁶⁻⁴⁸ (Figura 1.4).

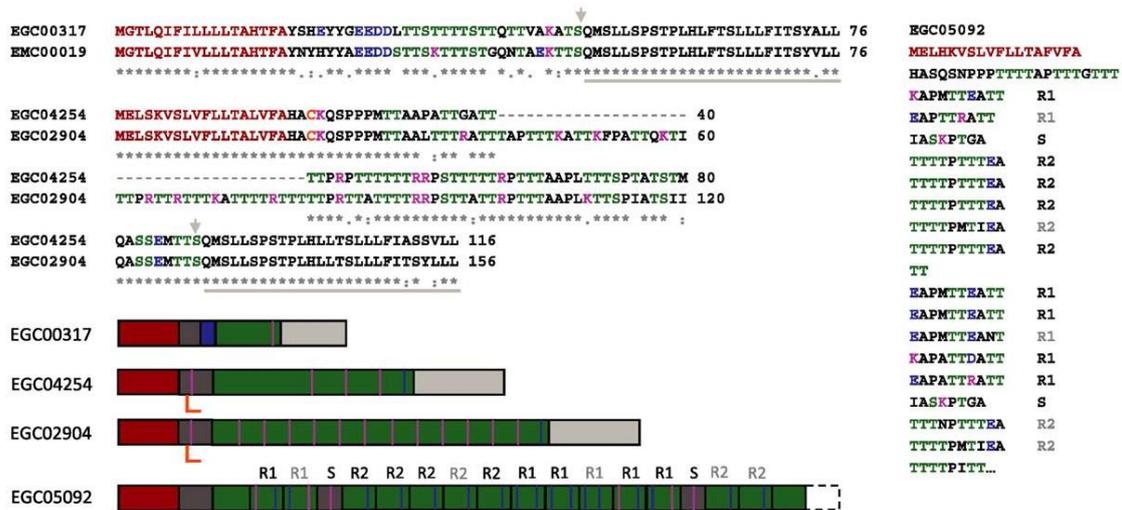


Figura 1.4. Organización molecular de apomucinas expresadas por la capa germinativa. Se muestran las secuencias predichas de las cuatro apomucinas candidatas a constituir la LL: EGC00317, EGC02904, EGC04254 y EGC05092. EGC00317 se muestra alineada con su ortólogo de *E. multilocularis*, EMC00019. EGC02904 y EGC04254, que están muy relacionadas. EGC05092 (cuya secuencia está incompleta) se muestra de forma de enfatizar los motivos repetidos (R1, S y R2), que corresponden a sitios predichos de O-glicosilación. Los residuos formando los péptidos señal predichos se muestran en rojo, y las extensiones C-terminales correspondientes a señales para la adición de anclas a GPI están marcadas con una línea gris por debajo. Además se indican: los residuos de Ser/Thr posiblemente O-glicosilados en verde, los residuos Asp/Glu en azul, los residuos Arg/Lys en magenta y las Cys desapareadas en anaranjado. Una representación esquemática de las características de estas apomucinas se incluye debajo utilizando los mismos colores. Tomado de ⁴⁶.

Los O-glicanos asociados a las mucinas animales sintetizados en el aparato de Golgi por adición secuencial de unidades de monosacáridos a cadenas laterales de serina o treonina de las apomucinas, llegando estos glicanos a comprender hasta el 90% del peso de la molécula. Los primeros dos o tres pasos biosintéticos son comunes entre varias estructuras de glicanos distintos, y por lo tanto comparten un núcleo (del inglés, *core*) mucínico común⁴⁹. Los *cores* más comunes son los denominados *core 1* (Galβ1-3GalNAc1α-Ser/Thr) y *core 2* (Galβ1-3[GlcNAcβ1-6]GalNAc1α-Ser/Thr), y son la base de todos los glicanos detectados en la LL (Figura 1.5). A nivel de monosacáridos, la LL de *E. granulosus* está constituida por residuos de galactosa (Gal), N-acetilgalactosamina

(GalNAc) y *N*-acetilglucosamina (GlcNAc)⁵⁰⁻⁵³, es decir una composición compatible con *O*-glicanos mucínicos, sin contribución significativa de *N*-glicanos (que invariablemente contienen manosa y *N*-acetilglucosamina). Las estructuras de los *O*-glicanos que decoran las mucinas de la LL se conocen en detalle^{52,54-56}. En estos glicanos, los *cores* 1 y 2 antes mencionados pueden ser elongados por adición de un número variable de unidades de Gal β 1-3, y esta cadena puede ser terminada por la adición de un residuo *cap* de Gal α 1-4⁵⁷. Por su parte, el residuo de GlcNAc del *core* 2 puede estar decorado con el disacárido Gal α 1-4Gal β 1-4, lo que lleva a la generación del motivo Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc, llamado motivo P₁, que también está presente en los glóbulos rojos de humanos con este grupo sanguíneo⁵³. En la LL de *E. granulosus* predominan los *cores* no decorados en relación a los glicanos más elaborados⁵².

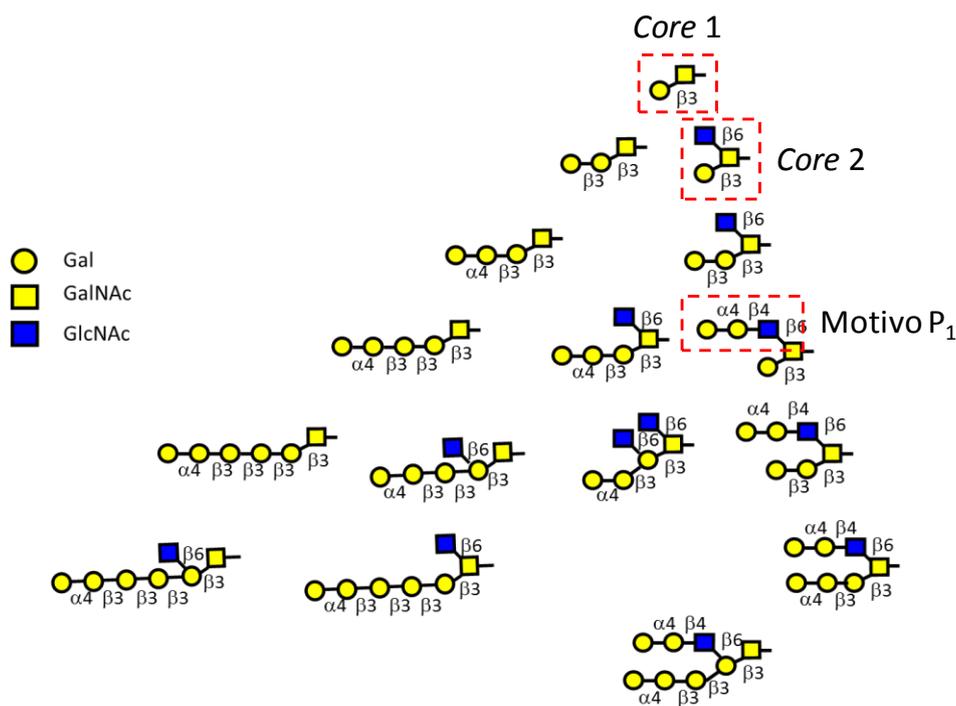


Figura 1.5. Estructura de los *O*-glicanos que decoran a las mucinas de la LL de *E. granulosus* s.l. Se esquematizan los principales *O*-glicanos presentes en la LL de *E. granulosus*. En los recuadros se destacan las estructuras del *core* 1 (Gal β 1-3GalNAc1 α -Ser/Thr), *core* 2 (Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc1 α -Ser/Thr) y del motivo P₁ (Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc). Los glicanos más abundantes de la LL son el *core* 1 no decorado convencional y el *core* 1 elongado por la adición de un residuo de Gal β 1-3. Además, se detectan glicanos adicionales que surgen de la elongación (por la adición de 1 a 3 residuos de Gal β 1-3) y por la adición de un “cap” (Gal α 1-4) a los *cores* 1 y 2.

Con respecto al ensamblaje de las mucinas de la LL, se especula que interacciones entre mucinas cortas generarían la estructura en fibrillas que se observa al microscopio electrónico, y que interacciones entre dichas fibrillas explicarían el ensamblaje de la malla tridimensional. Se cree que para la formación de ambos niveles estructurales serían importantes las interacciones entre los azúcares, a través de enlaces de hidrógeno, y también entre las apomucinas, posiblemente mediante la formación de puentes disulfuro e incluso a través de interacciones electrostáticas⁴⁰.

Finalmente, la composición de la LL de las diferentes especies de *Echinococcus* no es idéntica. Una diferencia muy llamativa es el gran grosor que presenta la LL de *E. granulosus sensu lato* (hasta 3 mm) en contraposición con la delgada LL que presenta *E. multilocularis* (10-12 μm)⁴⁰. Esta diferencia parece correlacionarse con la longitud que pueden alcanzar los glicanos mucínicos de ambas especies. La LL de *E. granulosus* está enriquecida en glicanos de mayor longitud que los presentes en la LL de *E. multilocularis*, lo cual posiblemente se deba a una menor expresión en *E. multilocularis* de la enzima encargada del paso de elongación (por adición de Gal β 1-3)^{43,56}.

1.2.4.1.2 myo-inositol hexakisfosfato

Los compuestos de *myo*-inositol fosforilados son componentes intracelulares, ubicuos de las células de los eucariotas. Entre estos compuestos, el *myo*-inositol hehakisfosfato (InsP₆), en el cual todas las posiciones del inositol están sustituidas por grupos fosfato, es el más abundante. El InsP₆ está presente en concentraciones de entre 10 a 100 μM en células de mamíferos, dependiendo del tipo celular y del estadio de diferenciación de la célula^{58,59}. Dada su alta capacidad para desprotonarse, el InsP₆ se asocia fuertemente con cationes di- y trivalentes, formando tanto complejos solubles como sales insolubles. En condiciones de exceso de cationes por mol de InsP₆ predomina la formación de productos insolubles^{60,61}. En animales existe solo un antecedente de la presencia de depósitos intracelulares de InsP₆ (insolubilizado como sal de Mg⁺⁺), en la larva del mesozoario *Dicyema typus*⁶². Hasta donde se conoce, en el resto de las células eucariotas, el InsP₆ no forma depósitos masivos como los mencionados previamente. En células de mamíferos, en particular el InsP₆ se encuentra en el citosol y en el núcleo^{63,64}.

Con respecto a *E. granulosus*, los resultados del grupo han mostrado que el InsP_6 es sorprendentemente abundante en la LL (aproximadamente el 30% de la masa seca total). Esta molécula también está presente, en cantidades menores, en la GL, donde se sintetizaría para luego ser secretado en forma polarizada hacia la LL. La molécula está ausente en los PSC, en el líquido hidático y en el estadio adulto del parásito. Como ya se mencionó, la sal cálcica del InsP_6 (junto con una pequeña proporción de sal magnésica) da lugar a los gránulos detectables al microscopio en la LL⁶⁵. El caso de *E. granulosus* constituye así la primera evidencia de la existencia de depósitos extracelulares de InsP_6 en eucariotas. Dada la formación de agregados insolubles de InsP_6 por asociación con calcio ($\text{InsP}_6\text{.Ca}$), el tratamiento de la LL con agentes quelantes de cationes divalentes (EDTA o EGTA) permite disolver los gránulos de la LL de forma selectiva⁶⁶.

Las funciones del InsP_6 citosólico/nuclear conservadas en los eucariotas no se comprenden bien. Entre múltiples funciones propuestas⁶³ resulta claro su papel en la exportación de ARN mensajeros del núcleo⁶⁷ y su papel como precursor de los pirofosfatos de inositol, que son moléculas de señalización⁶⁸. En cuanto a la función extracelular del InsP_6 en *E. granulosus*, datos obtenidos por el grupo de investigación demostraron que estos depósitos participan en el control de la activación de la cascada del complemento sobre la pared de la hidátide, como se describe en la sección 1.2.7^{69,70}.

1.2.4.1.3 Componentes no estructurales de la LL

La LL presenta una gran permeabilidad a macromoléculas de hasta 150 kDa, representando así una superficie tridimensional muy grande para la interacción con proteínas del hospedero⁷¹. La gran mayoría de las proteínas que aparecen asociadas a la LL, y de forma abundante, son la albúmina e inmunoglobulinas. Los anticuerpos se encuentran fuertemente unidos^{69,71-74}. En infecciones en humanos, estos anticuerpos pertenecen a las clases/subclases IgG1, IgG2, IgG4, IgA e IgE⁶⁹. La mayoría de estos permanecen unidos luego de la remoción del $\text{InsP}_6\text{.Ca}$ por tratamiento de la LL con EDTA, lo que sugiere que los mismos tienen especificidad por las mucinas. Aunque no se puede

descartar la presencia de anticuerpos con especificidad por las apomucinas en las infecciones por *E. granulosus*, la evidencia disponible sugiere que la gran mayoría de los mismos están unidos a los glicanos mucínicos^{40,53,75-78}.

1.2.5 Respuesta inmune frente a la larva de *E. granulosus* s.l.

Lo que se conoce hasta la fecha en cuanto a la interacción hospedero-parásito proviene en parte de estudios de infecciones naturales (ungulados y ser humano), principalmente observaciones histopatológicas y estudios de la respuesta de linfocitos T³⁵, y de estudios en el modelo de infección experimental, como se detalla a continuación.

En estudios histopatológicos se observó que la reacción local alrededor de la hidátide abarca un espectro amplio de morfologías, dependiendo principalmente de la especie de hospedero. Así, la reacción local puede ir desde una cápsula de colágeno pobremente infiltrada por células del sistema inmune (“capa adventicia”), hasta una reacción granulomatosa^{39,79,80}. La primera situación se observa generalmente en hospederos en los que el parásito se encuentra bien adaptado. En estos la hidátide logra resolver la respuesta inflamatoria, lo que favorece su supervivencia. Generalmente en estos casos las hidátides tienen un alto nivel de fertilidad (producción de PSC viables). Para *E. granulosus* s.s. esta situación se observa generalmente en humanos, y frecuentemente también en ovejas. Por el contrario, se observa una reacción inflamatoria que conduce a la formación de granulomas en los hospederos inadecuados para el parásito. En estos el control inflamatorio es menos efectivo, lo que se asocia a menores niveles de fertilidad de los PSC e incluso a degeneración de la hidátide. Para *E. granulosus* s.s., esta situación se observa en el ganado vacuno^{39,79}.

Por otro lado, la mayor parte de la información sobre esta infección proviene de experimentos empleando el modelo de infección secundaria intraperitoneal experimental en ratón, el cual reproduce en buena medida el control inflamatorio observado en las infecciones naturales⁸¹. En este modelo se utiliza a favor la plasticidad de los PSC de diferenciarse a hidátides en el hospedero intermediario. Este modelo consiste en la inyección de PSC en la cavidad peritoneal de ratones, imitando lo que

sucede en la infección natural en la que tras la ruptura de las hidátides se liberan los PSC al medio interno, en lo que se conoce como infección secundaria⁸². Basado en estudios previos la infección por *E. granulosus* se ha dividido en dos fases: la fase temprana o de establecimiento, en la cual el parásito es más susceptible al ataque de la respuesta inmune, y la fase tardía o crónica, durante la cual el parásito está protegido por la LL, y por lo tanto es más resistente a los mecanismos efectores inmunes⁸²⁻⁸⁵. Durante la infección temprana, en los primeros 3 a 5 días, el parásito induce una respuesta celular inflamatoria con la presencia de macrófagos, y el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos; estas células persisten junto con linfocitos, hasta que se alcanza la fase tardía. El comienzo de la fase tardía coincide en el tiempo con la implementación, por parte de *E. granulosus*, de mecanismos de evasión inmune y con la aparición de la LL, lo que conduce a la resolución de la respuesta inflamatoria casi en su completitud. A partir de este punto la hidátide crece lentamente en la cavidad peritoneal.

Con respecto a la respuesta inmune local a la infección experimental, datos obtenidos en la fase crónica mostraron un aumento en la celularidad de la cavidad peritoneal, siendo los macrófagos grandes de la cavidad (del inglés *large peritoneal macrophages*, LPM) y los eosinófilos los tipos celulares que más contribuyen a dicho aumento⁸¹. Con respecto al fenotipo de las poblaciones de macrófagos presentes en el sitio de infección, se observó que las mismas adoptan fenotipos M(IL-4), lo cual como se comentó previamente es parte de la respuesta tipo 2 que se monta tras las infecciones helmínticas. Sin embargo, estos macrófagos además de expresar los típicos marcadores M(IL-4) (Ym-1, Relm- α , arginasa-1)^{15,81}, expresan también los co-inhibidores PD-L1 y/o PD-L2⁸¹. Se ha observado en otros sistemas que la interacción de estos co-inhibidores con su receptor PD-1 expresado en linfocitos T, inhibe la activación y las funciones efectoras de estas células⁸⁶. Además en cavidad peritoneal de ratones infectados se detectó la expresión de IL-R1a, citoquina anti-inflamatoria que inhibe la unión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 α e IL-1 β a su receptor, inhibiendo los potentes efectos pro-inflamatorios de las mismas. Con respecto a la respuesta T local, se observó un aumento en la proporción de linfocitos Treg CD4⁺ FoxP₃⁺ (PD-1⁻) y de linfocitos T CD4⁺ PD-1⁺ (FoxP₃⁻), así como un aumento en la expresión de la citoquina anti-inflamatoria TGF- β , posiblemente producida por linfocitos T⁸¹.

Con respecto a la respuesta inmune sistémica, e integrando datos provenientes de infecciones en humanos con datos del modelo de infección experimental secundaria en ratón, se observó tanto una polarización hacia Th2, como sucede generalmente en infecciones por helmintos, como cierto nivel de respuesta Th1 y Th17^{35,87}. Estas últimas respuestas seguramente tengan que ver con la respuesta inflamatoria generada por la liberación de componentes propios dañados, dado el gran tamaño que puede adquirir la hidátide en el parénquima de los tejidos. Como se mencionó previamente, los helmintos parásitos pueden evadir la respuesta inmune al potenciar las respuestas reguladoras de sus hospederos. Las respuestas reguladoras deben ser muy eficientes en esta infección, ya que a pesar del gran tamaño que adquiere la hidátide, el hospedero no monta una respuesta inmune efectora acorde. De acuerdo con lo anterior, se observó un aumento significativo del porcentaje de linfocitos Treg en sangre e inducción de linfocitos T CD4⁺ que expresan PD-1^{35,88}. Además, se detectó un aumento de los niveles plasmáticos de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β ^{36,89}. También se observó el aumento de IgG4, subclase asociada normalmente a respuestas reguladoras⁹⁰.

En suma, la hidátide es capaz de promover una respuesta Th2, y a su vez desplegar mecanismos de evasión de la respuesta inmune que atenúan a la misma tanto a nivel local como sistémico, como sucede con la respuesta Th2 modificada descrita previamente.

1.2.6 La capa laminar y la respuesta inmune

Dada su localización y masividad, la LL constituye un elemento central en la relación hospedero-parásito. Se piensa que la LL es responsable al menos en parte del control inflamatorio local y la respuesta reguladora global. En concordancia con esto, la inflamación local que dispara el parásito en establecimiento se resuelve al mismo tiempo que comienza la síntesis de la LL⁸⁰.

Para permitir el crecimiento de la hidátide, tiene sentido postular que las capas más externas de la LL deben romperse para así liberar la presión generada. Dado el gran

tamaño de la LL, este proceso implicaría la liberación de una gran cantidad de material de la LL hacia los tejidos del hospedero. En este sentido, se observó que en infecciones en humanos por *E. granulosus*⁹¹ y por *E. multilocularis*^{42,92}, se acumulan materiales particulados de la LL, tanto en el sitio de la infección como en los ganglios drenantes del mismo. Estas partículas de la LL liberados presentan un tamaño de unos 2-20 μm en la vecindad del parásito, o menor a 1 μm en los ganglios drenantes. También se detectó material de la LL en vasos sanguíneos locales, así como en el hígado, en este último principalmente en los sinusoides hepáticos⁹¹. Así, las células inmunes locales pueden contactar con la superficie propiamente dicha de la LL, pero también con las partículas liberadas de ésta, halladas en el sitio de infección. Además, dado que dichos materiales de la LL pueden llegar a otras localizaciones en el organismo, los mismos podrían contactar con tipos celulares distantes, como los presentes en los órganos linfoides e hígado, entre otros. Es concebible que los materiales de la LL liberados, además de ser particulados, también pudieran estar en formato soluble y/o coloidal.

Nuestro grupo se ha enfocado en el estudio de los mecanismos regulatorios inducidos por la LL sobre el sistema inmune innato del hospedero intermediario. En ensayos *in vitro*, se observó que una preparación particulada de la LL (que imitaría a las partículas de la LL que se liberan durante la infección) induce sobre células dendríticas y macrófagos derivados de médula ósea de ratón un aumento en la expresión de la molécula co-estimuladora CD86, pero no de la molécula co-estimuladora CD40 o en la producción de citoquinas⁹³. Además, en presencia de agonistas de receptores tipo toll (del inglés, TLR), como los que se liberan *in vivo* por el daño tisular, las partículas de la LL inhiben la inducción de CD40 y la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-12, y en cambio aumentan la expresión de IL-10⁹³. Así, se postula que La LL induce, sobre estos tipos celulares, un fenotipo “semi-maduro” que podría ser potencialmente tolerogénico. Se ha visto que durante las infecciones por helmintos se induce la proliferación de macrófagos, mediada por IL-4, lo que constituye un mecanismo efector importante de las respuestas de tipo 2^{12,94}. Datos obtenidos por el grupo mostraron que las partículas de la LL inhiben la proliferación *in vivo* de macrófagos inducida por IL-4 o M-CSF exógenos⁹⁵. Interesantemente los efectos inducidos por la LL sobre los tipos celulares mencionados no parecen depender de los carbohidratos presentes en la LL⁷⁰. Se ha

propuesto que los efectos se pueden explicar por un mecanismo conocido como MATS (por sus siglas en inglés, *membrane affinity triggered signaling*)⁹⁶. Este mecanismo postula que el contacto de ciertos materiales insolubles con la membrana plasmática de las células mieloides produce un re-organizamiento de las balsas lipídicas, induciendo señalización independiente de receptores⁹⁷.

Además de condicionar a células mieloides, la LL actúa regulando otra rama importante del sistema inmune innato, el sistema complemento. Resultados obtenidos por el grupo de investigación evidenciaron que la LL es capaz de regular la activación del sistema complemento sobre su superficie, de forma tal de controlar la formación de mediadores pro-inflamatorios que podrían dañar a la larva⁹⁸. Así, la LL puede controlar la activación de la vía alternativa, mediante el secuestro del inhibidor factor H^{99,100}. Por otro lado, como se mencionó en la sección 1.2.5.1.3, sobre la LL se encuentran unidos anticuerpos activadores de complemento sobre los cuales podría activarse la vía clásica (VC) a través de la unión de C1q a la porción Fc de los mismos⁶⁹. Sin embargo, la mayor proporción de C1q unido por la LL no está asociada a los anticuerpos sino a los depósitos de $InsP_6$ cálcico. Interesantemente, la unión de C1q al $InsP_6$ cálcico promueve una activación de la VC ineficiente en comparación con la activación sobre los anticuerpos, similar a lo que sucede con otros polianiones que unen C1q^{69,101}. Además, el C3b depositado sobre los depósitos de $InsP_6$ tras la activación del complemento es inactivado rápidamente. Así, el $InsP_6$ podría controlar la disponibilidad de C1q y evitar la activación de la VC sobre los anticuerpos que están unidos a la GL, lo que de ocurrir podría dañar a la larva^{69,70}.

Estas evidencias parecen indicar que los motivos moleculares presentes en la LL son decodificados por el sistema inmune como material inocuo, o incluso tolerogénico. Consistente con este último planteo, en un modelo animal de colitis aguda, el pre-tratamiento de ratones con una preparación de LL redujo significativamente la severidad de la enfermedad¹⁰². Por otro lado, en el modelo de infección intraperitoneal, el parásito alojado en la cavidad peritoneal logró regular las respuestas en hígado, favoreciendo el desarrollo de metástasis hepática de un cáncer experimental inicialmente subcutáneo¹⁰³.

1.2.6.1 Posible interacción de la LL con receptores innatos del hospedero

Como se mencionó previamente, los efectos de la LL sobre las células mieloides descritos hasta la fecha no resultaron depender de la interacción específica entre un receptor y un componente definido de la LL^{93,95,104}. Aun así, la liberación al medio interno durante la infección de una gran cantidad de partículas de la LL, ricas en glicanos mucínicos, hacía importante el estudio del posible reconocimiento de dichos glicanos por parte de otros receptores innatos para carbohidratos (lectinas) del hospedero, que no estuvieran expresados en los modelos celulares empleados hasta el momento. En la búsqueda de posible/s candidato/s, se ensayó la unión de un panel de 36 receptores innatos con dominio lectina y de expresión conocida en macrófagos, humanos o de ratón, a una preparación solubilizada de LL, en ensayos en formato *in vitro*¹⁰⁵. En dicho panel, los receptores, obtenidos por expresión recombinante, estaban en presentación dimérica, por estar fusionados al fragmento Fc de IgG1 humana. Interesantemente, de dicho panel solo el receptor lectina Clec4F se unió significativamente a las mucinas de la LL (Figura 1.6). La unión a los glicanos de la LL fue dependiente de calcio y fue específica, ya que pudo ser competida por la adición de un exceso de mucinas de la LL solubilizadas¹⁰⁵. Se observó además, que esta versión de Clec4F recombinante dimérico no solamente se unió a las mucinas de la LL de *E. granulosus*, sino que también se unió fuertemente a la LL de *E. multilocularis*¹⁰⁵. Clec4F recombinante se unió también a glicanos sintéticos representativos de LL de *E. granulosus* y/o *E. multilocularis*, llevando (junto a datos previamente disponibles) a la conclusión preliminar que Clec4F reconocería en la LL los motivos *core 1* no decorado, motivo P1 y estructuras terminadas en Gal α 1-4Gal β 1-3GalNac/Gal (descritos en la sección 1.2.5.1.1)¹⁰⁵. Sin embargo resta verificar que Clec4F nativo (trimérico) también pueda unirse a la LL, como lo hizo su versión recombinante dimérica, y por supuesto explorar las posibles consecuencias de esa posible interacción. Clec4F, que se describe en detalle en la sección 1.3.1, se expresa en roedores solamente en las células de Kupffer (principales macrófagos hepáticos)¹¹³⁻¹¹⁵, por lo que no se expresa en los modelos empleados hasta el momento para el estudio de los efectos de la LL sobre las respuestas de células mieloides, detallados previamente.

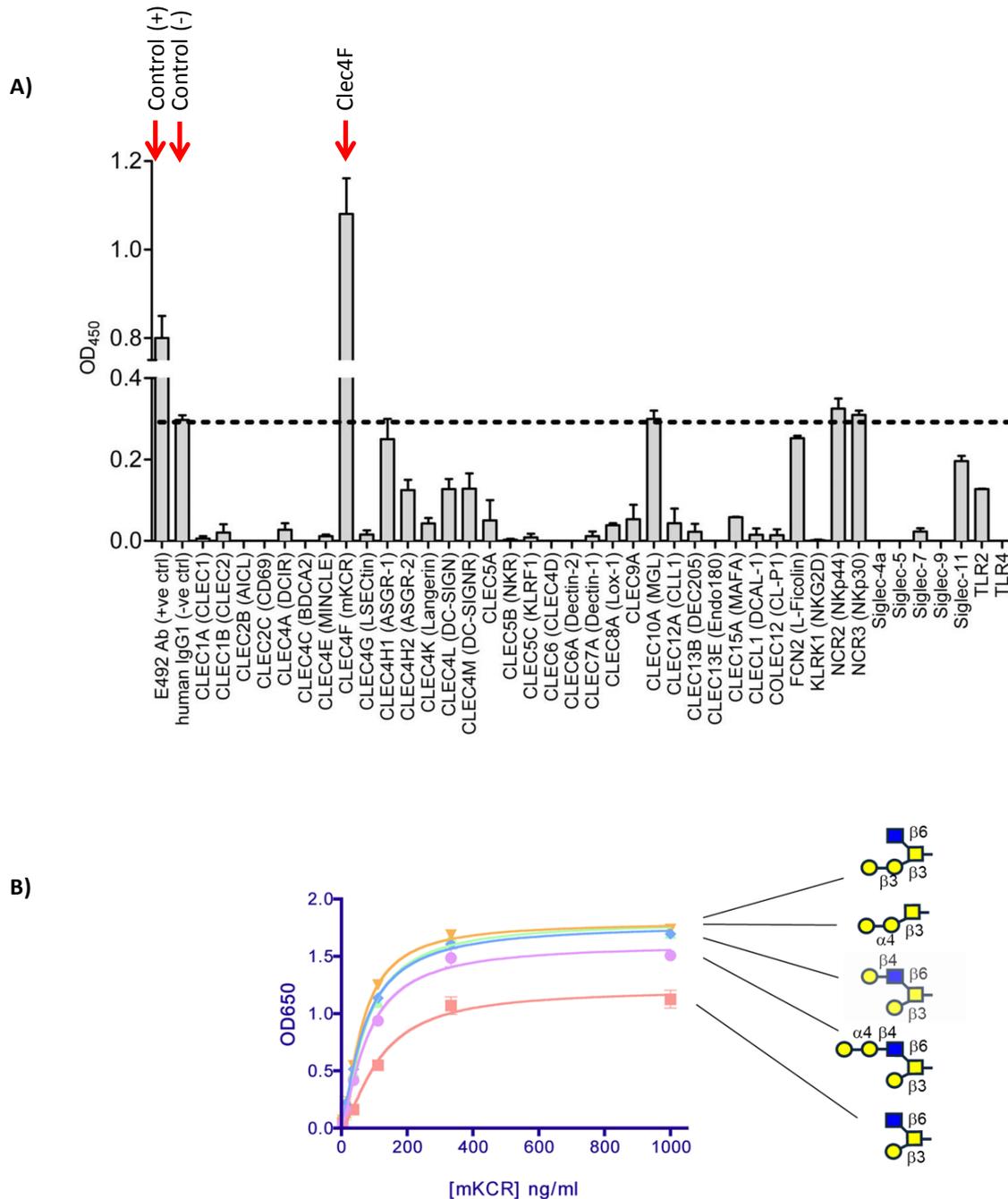


Figura 1.6. Interacción entre Clec4F recombinante y la LL. (A) Estudio de la unión de receptores recombinantes (humanos y de ratón), expresados como proteínas de fusión a fragmento Fc de IgG1, a las mucinas de la LL, solubilizadas y adsorbidas a una placa de ELISA. Se observa que solo Clec4F se unió de manera significativa a mucinas de la LL. (B) Unión de Clec4F recombinante a glicanos sintéticos representativos de los principales motivos presentes en la LL de *E. granulosus* y/o de *E. multilocularis*, estudiada por competencia de la unión a mucinas enteras, adsorbidas al plástico. Se observa que Clec4F se une a diversos glicanos de la LL (tomado y modificado de ¹⁰⁵).

1.3 Generalidades de lectinas tipo C

El sistema inmune innato tiene la capacidad de discriminar entre componentes propios, propios alterados y no propios, y así de dirigir respuestas inmunes acordes. Entre las familias de receptores innatos que realizan esta discriminación se encuentran los receptores lectinas de tipo C (CLR, del inglés *C-type lectin receptors*)¹⁰⁶. Los CLR constituyen un gran grupo de proteínas capaces de reconocer un amplio rango de ligandos glicosilados endógenos y exógenos. Todos los miembros de este grupo poseen uno o más dominios globulares similares a lectina tipo C (CTLD, del inglés *C-type lectin-like domain*). Originalmente las CLR fueron definidas en base a su capacidad de reconocer a sus ligandos en forma dependiente de calcio, a través de residuos aminoacídicos conservados dentro del CTLD (Glu-Pro-Asn para reconocimiento de manosa y Gln-Pro-Asp para reconocimiento de galactosa)¹⁰⁷. Sin embargo, posteriormente se ha evidenciado la existencia de varios dominios de lectina tipo C que no dependen de calcio para la unión a sus ligandos, usándose entonces actualmente el término CTLD de forma general para agrupar a estos dominios presentes en las CLR, definidos estructuralmente. Tradicionalmente se consideraban a las CLR de superficie celular como receptores solamente endocíticos, pero hoy se conoce que varios CLR tienen la capacidad de generar, en células mieloides, señales que promueven respuestas efectoras, o por el contrario la supresión de las mismas; así varios CLR son empleados por patógenos para evadir las respuestas inmunes^{108,109}.

1.3.1 Clec4F

Clec4F está dentro de los CLR menos estudiados. Este CLR está codificado por un único gen que presenta ortólogos 1:1 dentro de los mamíferos. Clec4F nativo fue purificado por primera vez a partir de hígado de rata¹¹⁰. Los autores emplearon la afinidad de Clec4F por fucosa (Fuc) para separarlo de otros receptores para carbohidratos expresados en hígado, que en ese momento se conocían como la "lectina específica de galactosa" (receptor de asialoglicoproteínas, del inglés ASGR) y la "lectina específica de manosa-*N*-acetilglucosamina" (receptor de manosa). Debido a su afinidad por Fuc, Clec4F fue inicialmente denominado "receptor de fucosa". Poco después el mismo

grupo de investigación determinó que este receptor también podía reconocer residuos terminales no reductores de Gal o GalNAc unidos al mismo residuo sub-terminal al que está unido el residuo terminal de Fuc, es decir reconocer al motivo Lewis^x (Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc)¹¹¹. Datos obtenidos también por el mismo grupo de investigación revelaron que, en rata, esta lectina se expresaba en los en los macrófagos residentes del hígado (las células de Kupffer, del inglés KC)¹¹².

Clec4F ha sido estudiado casi exclusivamente en roedores. En ratones, en los que el receptor se expresa solamente en las KC¹¹² y en macrófagos derivados de monocitos que infiltran el hígado¹¹³, Clec4F es empleado como marcador para definir KC en citometría de flujo o inmunohistoquímica¹¹³⁻¹¹⁵. La selectividad de expresión es algo menos marcada en rata¹¹⁶, especie en la que se detecta expresión del gen en pulmón además de en el hígado¹¹⁶.

A nivel genómico, Clec4F está codificado por siete exones. Los exones 1, 2, 3 y 4 codifican respectivamente para las regiones citosólica, transmembrana, extracelular previa a la estructura de tipo “*coiled coil*” (conocido como “tallo”), y el propio tallo *coiled-coil*. Los exones 5-7 codifican para el dominio de unión a carbohidratos (CTLD)¹¹⁶. A nivel de proteína, Clec4F es un homo-trímero transmembrana de tipo II. Consta de un dominio N-terminal citosólico, un domino transmembrana y un ectodominio, formado por una región en α-hélice larga (de aproximadamente 50 nm) que trimeriza formando el “*coiled coil*”^{117,118} y por el CTLD C-terminal (Figura 1.7). El programa *AlphaFold II* para predicción de estructura *in silico*, disponible en Uniprot, predice para Clec4F en su forma monomérica una pequeña región en la que el *coiled coil* podría plegarse sobre sí mismo. La herramienta de predicción de N-glicosilación NetNGlyc, disponible en Expasy, predice que a lo largo del *coiled coil* de Clec4F de ratón, y la región extracelular inmediatamente previa a éste, se encuentran 6 sitios de N-glicosilación.

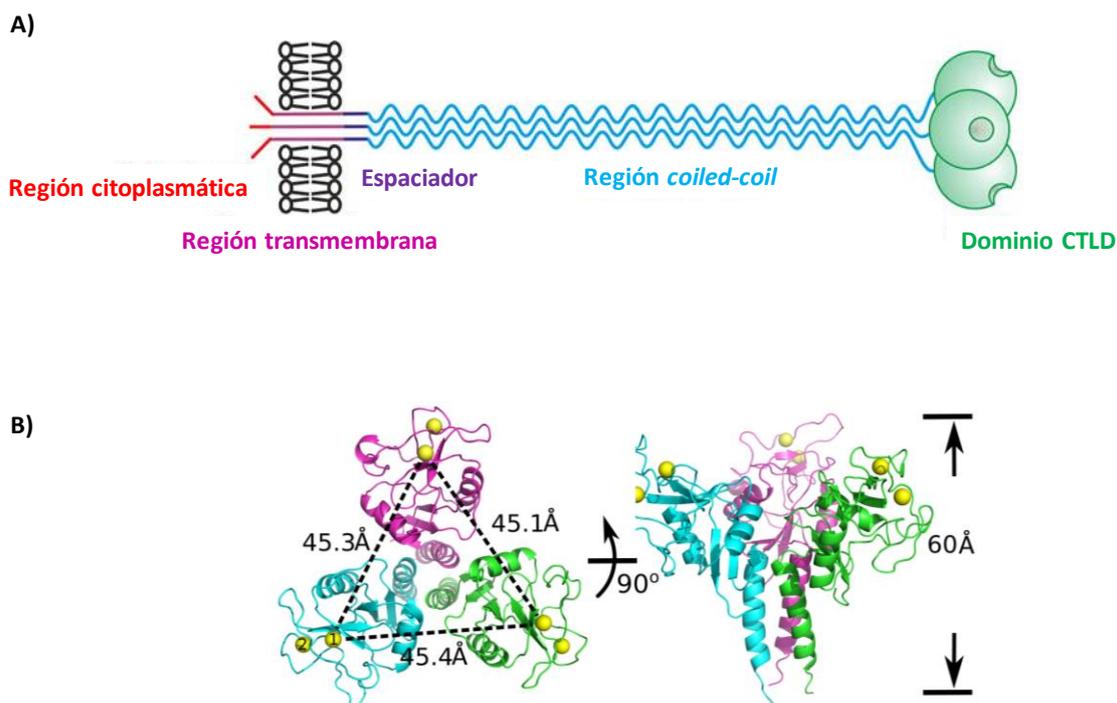


Figura 1.7. Estructura de Clec4F de ratón. (A) Diagrama representativo de los dominios de la estructura trimérica de Clec4F, tomado y modificado de Taylor *et al.* 2019¹¹⁶. (B) Se muestra la vista superior y frontal de la estructura trimérica del dominio CTLD de Clec4F obtenida por cristalografía. Los iones de calcio están representados como esferas amarillas, mientras que la distancia entre los iones de calcio entre CTLD de monómeros vecinos está indicada con línea punteada, tomado y modificado de Ouyang *et al.* 2019¹¹⁸.

Los datos disponibles sobre la función de Clec4F son limitados. Se postula que Clec4F podría ser un receptor endocítico¹¹⁷, ya que libera el ligando a pH endosomal¹¹⁰, como es requerido en la endocitosis mediada por receptor. Sin embargo, hasta la fecha, esto no ha podido ser comprobado. Tras la expresión forzada de Clec4F de rata en fibroblastos, no se detectó internalización de Gal acoplada a seroalbúmina bovina (BSA), empleado como ligando, por lo que los autores especulan que tal vez Clec4F requiera de proteínas accesorias presentes en las KC para mediar la internalización del ligando¹¹⁹. La cola citosólica del receptor no contiene motivos de señalización conocidos. Sin embargo, existen CLRs que señalizan por asociación con adaptadores citosólicos^{106,108,120}. En varios casos, esta asociación depende de un aminoácido positivamente cargado en la región transmembrana del receptor¹²¹, característica que está ausente en Clec4F; sin embargo, existen también casos de CLRs que se asocian a adaptadores en forma independiente de ese motivo¹²².

Estudios recientes realizados en ratones demostraron que Clec4F participa en la captación por KC de plaquetas cuyos glicanos han perdido el ácido siálico terminal (es decir que han sido de-sialiladas), exponiendo así los residuos subterminales de Gal^{123,124}. Esta captación depende además de la colaboración de al menos una de las lectinas de tipo C, ASGR y/o la lectina de unión a Gal de macrófagos (del inglés, MGL), y de especificidad relacionada a Clec4F¹¹⁹. Cabe destacar que mientras que en humanos solo está presente una variante de MGL (hMGL), el genoma del ratón codifica para los parálogos MGL-1 y MGL-2. MGL-1 reconoce al motivo Lewis^x, mientras que MGL-2 tiene una especificidad similar a hMGL, reconociendo carbohidratos que contienen residuos de GalNAc terminales¹²⁵. En el trabajo de Jiang *et al.* 2021¹²⁴ no se determinó cuál(es) MGL de ratón participaría(n) en la captación de plaquetas por las KC. Si bien ASGR ha sido clásicamente definido como el receptor de los hepatocitos, recientemente se detectó su expresión, aunque a bajos niveles, en las KC¹²³. MGL también se expresa en las KC. La evidencia de captación de plaquetas de-sialiladas fue obtenida en una situación no fisiológica, en la cual se genera una de-sialilación a gran escala de células/proteínas del espacio vascular a través de una inyección intravenosa de neuroaminidasa bacteriana. Con respecto a la remoción de plaquetas de-sialiladas en condiciones homeostáticas, presumiblemente por sialidasas endógenas, se ha visto que esta función también está a cargo de las KC¹²⁶. Sin embargo, parecería que Clec4F no participa en la remoción de plaquetas envejecidas en condiciones homeostáticas¹²⁴ (y datos no publicados de nuestro grupo).

Datos de transcriptómica surgidos en los últimos años evidenciaron la expresión de Clec4F en mamíferos no roedores. En ungulados (incluyendo bovinos), Clec4F se expresa en órganos linfoides además de expresarse en el hígado¹¹⁶. En primates no humanos, existe expresión en órganos linfoides pero no en hígado¹¹⁶. Interesantemente, en humanos el gen de Clec4F presenta una mutación que determina que el gen se exprese, a nivel de ARN mensajero, en muy bajos niveles, y que de ser traducido a proteína daría lugar a un dominio lectina truncado, no funcional¹¹⁶.

Con respecto a la especificidad de Clec4F de especies no roedores, el análisis por alineamiento de secuencias de las CTLD de todos los genes de *Clec4f* publicados evidenció que las mismas (a excepción del gen humano) presentan un alto grado de conservación de residuos aminoacídicos canónicos asociados con el plegamiento del CTLD y con la formación de un sitio de unión a Gal y GalNAc¹¹⁶. Datos obtenidos con las proteínas nativas o con los dominios CTLD obtenidos de forma recombinante, de distintas especies, en ensayos de arreglos con glicanos (“*glycan arrays*”), confirmaron la especificidad de Clec4F por Gal y GalNAc, pero demostraron que existen diferencias en la especificidad fina entre ortólogos. Así, como se mencionó previamente, Clec4F de roedores reconoce oligosacáridos que exponen residuos de Gal o GalNAc terminales en contextos sin fucosilar, así como también a motivos de Lewis X y Lewis A (que incluyen un residuo de Gal y uno de Fuc, ambos terminales), por lo que en estos animales la especificidad de Clec4F es bastante amplia^{111,112,119,127}. En cambio, se observó que una versión recombinante de Clec4F de vaca tiene una especificidad más restringida, ya que tiene preferencia por motivos de Lewis X y Lewis A por sobre los motivos que contienen Gal en contextos sin fucosilar¹¹⁶. En forma algo contrastante, el dominio lectina de Clec4F de chimpancé, expresado también de forma recombinante, mostró una especificidad amplia, sesgada hacia glicanos terminados en Gal o GalNAc sin fucosilar¹¹⁶.

En el modelo animal (ratón) con el que se trabajó en la presente Tesis, Clec4F solamente se expresa, como ya se introdujo, en las KC. Por esta razón, en la siguiente sección se introducen aspectos relevantes de la inmunología del hígado en general y de las KC en particular.

1.4 Hígado

El hígado es el órgano interno sólido más grande del cuerpo. Además de realizar funciones esenciales como la producción de proteínas, metabolismo de nutrientes y eliminación de toxinas, cumple importantes funciones inmunológicas. Dentro de las funciones inmunes realizadas por este órgano, se encuentran la producción de proteínas de fase aguda y de componentes de complemento, así como la capacidad de montar respuestas inmunes innatas y adaptativas, como se describe más adelante¹²⁸.

El hígado humano recibe aproximadamente 1.5 L de sangre por minuto, de los cuales el 80 % proviene del intestino a través de la vena porta, y el 20 % restante de la circulación sistémica a través de la arteria hepática¹²⁹⁻¹³¹. En condiciones basales, este suministro de sangre contiene una gran cantidad de antígenos inocuos, dietarios y de la microflora, a los cuales el hígado debe permanecer tolerante, es decir no montar respuestas efectoras contra los mismos. Sin embargo, el hígado también debe ser capaz de responder a una variedad patógenos bacterianos, virales y parasitarios que puedan infectar a este órgano. Se dice que el hígado actúa como un filtro inmunológico de la sangre; la concentración de lipopolisacárido (LPS) bacteriano es 100 veces menor en sangre periférica venosa que en sangre portal, es decir que disminuye 100 veces tras el pasaje por el hígado¹³⁰.

1.4.1 Estructura del hígado

La arquitectura anatómica única y la diversidad de los tipos celulares presentes en este órgano le permiten realizar las funciones mencionadas previamente. El hígado está organizado en unidades denominadas lobulillos hepáticos, los cuales contienen varias estructuras llamadas tríadas portales (ramas de arteria hepática, vena porta y conducto biliar), hepatocitos organizados en cordones lineales ubicados entre una amplia red de vasos capilares especializados, llamados sinusoides hepáticos, y la vena central (Figura 1. 8). Así, la sangre que entra al hígado circula a través de los sinusoides desde la tríada portal hacia la vena central, a una velocidad que es al menos la mitad de la presente en

otros capilares, lo que maximiza la probabilidad de detectar y eliminar moléculas, partículas y/o patógenos por parte de este órgano¹³⁰.

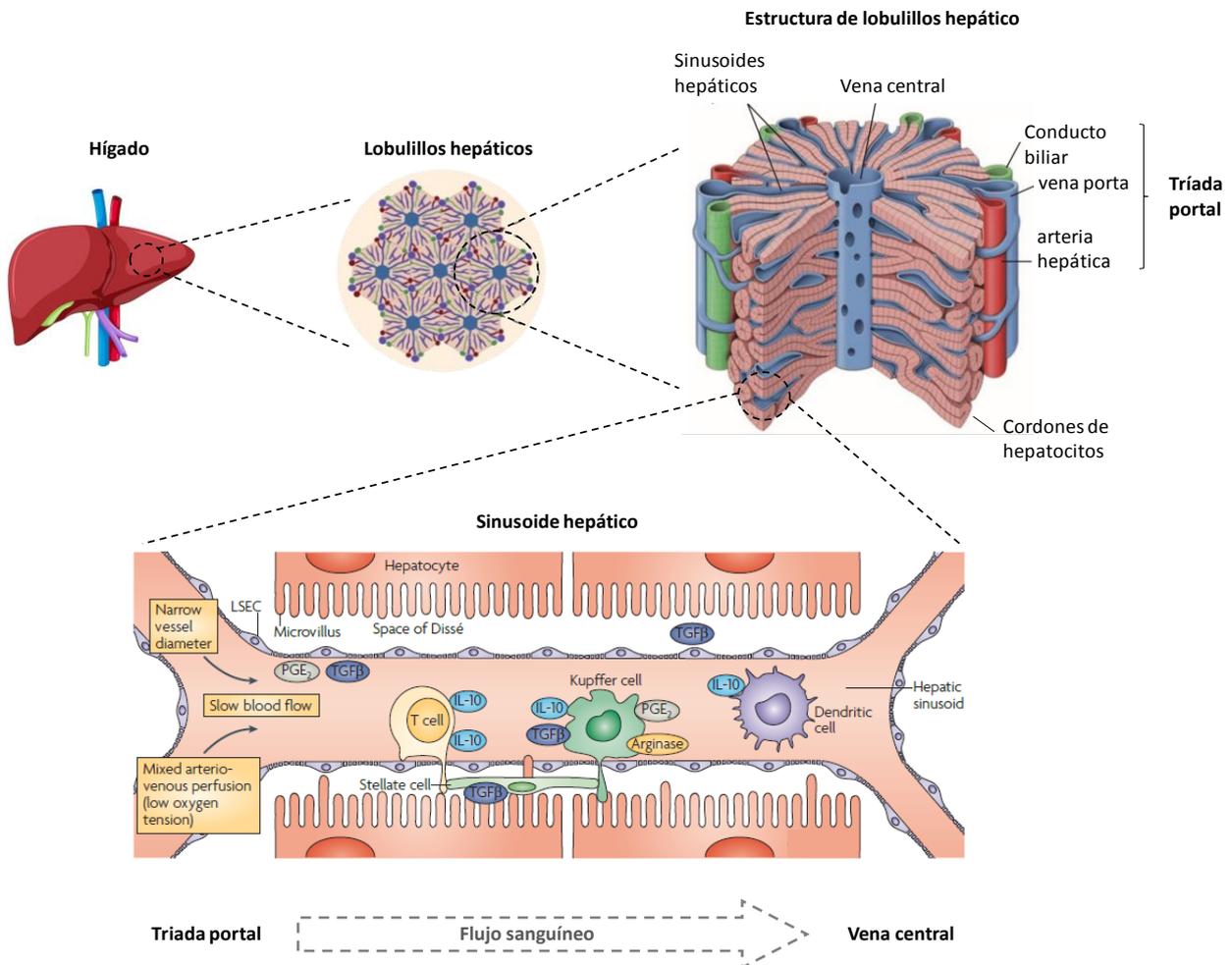


Figura 1.8. Organización estructural del hígado. El hígado está organizado en lobulillos hepáticos hexagonales los cuales contienen varias triadas portales, hepatocitos organizados en cordones lineales, los sinusoides hepáticos, y ramas de la vena central. La sangre llega al hígado desde la circulación portal (a través de las triadas portales) y circula por los sinusoides hepáticos hacia la vena central para retornar a la circulación sistémica. Los sinusoides hepáticos están delimitados por las LSEC, células endoteliales especializadas. Entre los cordones de los hepatocitos y las LSEC, se encuentra el espacio de Dissé, en el que se residen las células estrelladas o células de Ito. Dentro de los sinusoides reside una gran diversidad de células del sistema inmune innato (KC, CD, células *Natural Killer*, células T invariantes asociadas a la mucosa-MAIT, linfocitos $TY\delta$) y adaptativo (linfocitos T $CD4^+$, linfocitos T $CD8^+$). Abreviaciones: KC: células de Kupffer, CD: células dendríticas, LSEC: células endoteliales sinusoidales del hígado. Figura tomada y modificada de Thomson *et al.* 2010¹³².

En la luz de los sinusoides hepáticos residen una gran variedad de células inmunes que actúan como centinelas especializadas en la captura y eliminación de patógenos y

moléculas asociadas a los mismos en circulación, en la liberación de citoquinas, y en la presentación de antígenos a los linfocitos T. Las células residentes incluyen células presentadoras de antígeno profesionales (del inglés, APC), así como también poblaciones de linfocitos innatos (células *Natural Killer*, células NKT, células T invariantes asociadas a la mucosa-MAIT, linfocitos $\text{TY}\delta$) y de linfocitos adaptativos (T CD4^+ y T CD8^+)^{128,129,132}. Dentro de las APC, se encuentran poblaciones de células dendríticas (CD), pero destacan las KC, que constituyen la mayor población de macrófagos residentes del cuerpo, como se detalla a continuación.

Los sinusoides hepáticos se encuentran delimitados por células endoteliales especializadas, las células del endotelio sinusoidal hepático (LSEC por su sigla en inglés). Entre los cordones de los hepatocitos y las LSEC se encuentra el espacio de Dissé, en el que residen células parenquimales llamadas estrelladas o células de Ito. Las LSEC tienen un número elevado de fenestraciones organizadas en estructuras denominadas placas de tamices (del inglés, *sieve plates*)¹³³ (Figura 1.9.). La ausencia de membrana basal en el endotelio sinusoidal permite que a través de estas fenestraciones ocurra el contacto entre el contenido de los sinusoides y el contenido del espacio de Dissé. De esta manera los hepatocitos y las células estrelladas, pese a no encontrarse dentro de los sinusoides, están expuestos a la sangre proveniente del intestino y de la circulación sistémica. Además, a través de las fenestraciones se permite el contacto de las células en la luz del sinusoide con las parenquimales, como por ejemplo, el contacto entre linfocitos T y los hepatocitos (Figura 1.9)^{129,134}.

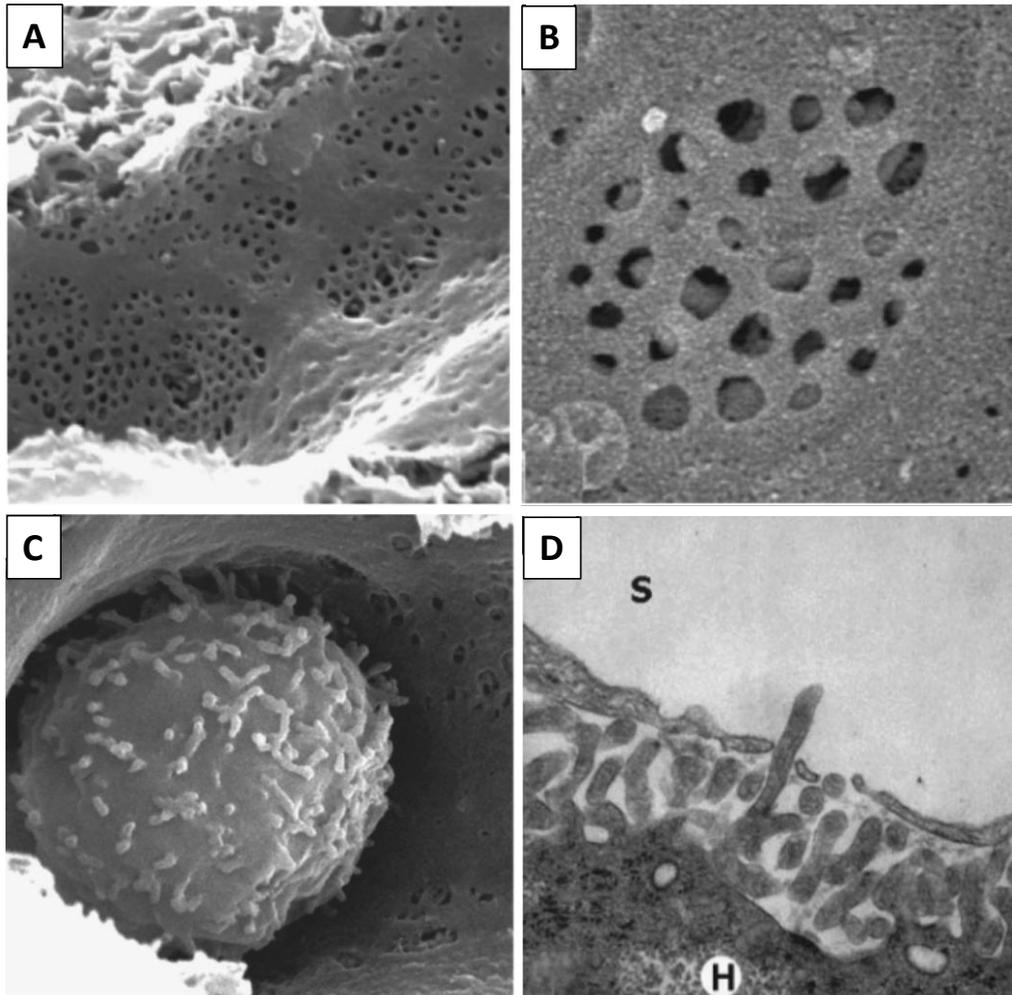


Figura 1.9. Ultraestructura del endotelio de los sinusoides hepáticos. (A) Micrografía electrónica de barrido de LSECs, magnificación original x 15000. (B) Mayor magnificación de micrografía mostrada en (A), se aprecia una agrupación de fenestraciones, una placa de tamices (*sieve plate*). Debajo del endotelio se pueden apreciar las microvellosidades de los hepatocitos (H), gracias a la ausencia de membrana basal entre los hepatocitos y las LSEC, magnificación original x 20000. (C) micrografía electrónica de barrido de un linfocito (L) dentro del lumen del sinusoides hepático (S). Se puede apreciar que las extensiones citoplasmáticas del L tienen un diámetro similar al que presentan las fenestraciones de las LSEC, magnificación original x 12000. (D) Micrografía electrónica de transmisión de microvellosidad de hepatocito que protruye al lumen sinusoidal a través de las fenestraciones del endotelio, magnificación original x 40000. Referencias: H: hepatocito, L: linfocito, S: sinusoides hepático. Tomado y modificado de Horst *et al.* 2026¹²⁹.

1.4.2 Células de Kupffer (KC)

Las KC constituyen la mayor población de macrófagos residentes del cuerpo, abarcando el 90 % de la totalidad de los macrófagos de todos los tejidos, y el 35 % de las células no parenquimales del hígado¹³⁰. La mayoría de las KC derivan del saco vitelino, se establecen en el hígado fetal durante la embriogénesis, y se mantienen durante la vida del individuo mediante proliferación local¹³⁵. Sin embargo, durante procesos de inflamación hepática, estrés o daño, aumenta la proporción de KC que proviene de la diferenciación de monocitos derivados de la médula ósea, los cuales también pueden proliferar¹¹³. Las KC están expuestas a la luz de los sinusoides hepáticos, en íntimo contacto con las LSEC¹¹⁴. Esta ubicación estratégica les permite captar rápidamente a sus ligandos y removerlos de la circulación, como se describe más adelante. Las KC son células altamente plásticas y en condiciones basales presentan un fenotipo de tipo M(IL-4) y asociado a respuestas anti-inflamatorias, que conduce a la inducción de respuestas de tipo tolerogénicas¹²⁹. Sin embargo, pueden revertir este fenotipo hacia un fenotipo M1 en condiciones de inflamación, como las que se presentan en infecciones hepáticas, en enfermedades autoinmunes o en situaciones de disfunción metabólica (como por ejemplo en los casos de abuso de alcohol)^{128,129}.

1.4.3 Capacidad endocítica de las células del hígado

La remoción de los componentes no deseados de la circulación es realizada por varios tipos celulares hepáticos, siendo los principales las KC, LSEC y los hepatocitos. El tamaño del ligando a eliminar dictará qué tipo celular será el encargado de remover a dicho ligando^{136,137}. Las KC se especializan en la captación de materiales particulados con tamaños de hasta algunas decenas de μm de diámetro, como glóbulos rojos oxidados, neutrófilos apoptóticos, plaquetas envejecidas y patógenos circulantes^{124,138-140}. La gran capacidad de las KC de remover bacterias de la circulación se evidencia tras la depleción de estas células, lo que conduce a un aumento en la diseminación bacteriana, lo que finalmente conduce a la muerte del individuo¹²⁹.

Para cumplir las funciones recién mencionadas, las KC cuentan con una gran batería de receptores. Entre estos se cuentan los receptores para opsoninas de complemento (como C3b e iC3b), que son capaces de unirse a sus ligandos y mediar la captación por KC en condiciones de flujo. Entre los receptores para C3b e iC3b expresados en KC se destaca el receptor de complemento de la superfamilia de las inmunoglobulinas (del inglés, CR1g), también llamado VSIG4¹⁴¹. Además, las KC cuentan con receptores para Fc de anticuerpos IgA e IgG, receptores *scavenger* (MARCO, SR-A), y con varias lectinas, como el receptor de manosa (CD206), CLEC2, MGL, y de interés especial para la presente Tesis, Clec4F, que se describió en la sección 1.3.1^{115,132,142}.

Las LSEC interactúan intensamente con los leucocitos que circulan por los sinusoides y están involucradas en el reclutamiento de dichos leucocitos al hígado. Si bien las LSEC no son de origen hematopoyético, y por lo tanto no son células inmunes, actúan como tales. Tienen una gran capacidad endocítica, están especializadas en la captura de partículas/moléculas de tamaños inferiores a 200 nm¹³⁶. Así, son responsables de la eliminación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, productos de desechos generados durante el recambio normal de los tejidos, y pequeños inmunocomplejos solubles^{136,143}. Además, pueden eliminar patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, PAMPs), como el LPS o el ácido lipoteicoico, los cuales tienen la potencialidad de activar células inmunes si se les permite circular. La gran capacidad endocítica de estas células está favorecida por la variedad de receptores que presentan. Entre estos se encuentran receptores para la región Fc de anticuerpos y receptores *scavenger* (stabilina-2, stabilina-1, CD36). Además, las LSEC poseen varios receptores lectina, entre los que destaca el receptor de manosa, L-SECTin y L-SIGN^{133,136,144}.

Los hepatocitos tienen una gran capacidad endocítica y pueden captar ligandos de hasta 50-70 nm de tamaño, es decir moléculas solubles con tamaños del orden de complejos de proteínas. En estas células se destaca la presencia del ASGR, que participa en la remoción de la circulación de glicoproteínas solubles que, por envejecimiento, han perdido el ácido siálico terminal y por lo tanto exponen residuos Gal o GalNAc subterminales^{145,146}.

Así globalmente, el hígado elimina de la circulación a bacterias y productos bacterianos provenientes del intestino, glicoproteínas y células sanguíneas envejecidas, presentes en la circulación sistémica, y residuos de la matriz extracelular generados en los tejidos.

1.4.4 Respuestas inmunes montadas en hígado

El hígado es un órgano de inducción de respuesta inmunes innatas y adaptativas. En condiciones basales, estas respuestas son de tipo anti-inflamatorias y tolerogénicas, y se producen frente a antígenos dietarios y de la microflora. A continuación, se describen, brevemente, aspectos de estas respuestas en condiciones fisiológicas.

1.4.4.1 Respuestas inmunes innatas

Como se mencionó previamente, las KC, LSEC, y CD, entre otras células presentes en el hígado, cuentan con una gran batería de receptores inmunes innatos, como son los receptores endocíticos/fagocíticos (lectinas, *scavenger*, para componentes de complemento, para receptores Fc de anticuerpos), que les permiten a estas células remover materiales no deseados de la circulación. Además, estas células cuentan con receptores no endocíticos (TLRs, RIG-I, NOD, STING) que les permiten detectar la presencia de PAMPs en el entorno hepático y responder rápidamente a la misma¹⁴⁷.

En condiciones basales, la remoción de la circulación de componentes no deseados por el hígado no conlleva la producción de mediadores pro-inflamatorios, como en cambio generalmente ocurre en otros órganos tras el reconocimiento de PAMPs o de motivos de daño tisular. En el hígado, el desarrollo de la inflamación frente a LPS, en particular, es contenido por un mecanismo denominado “tolerancia a endotoxinas”, que implica un estado refractario a la estimulación repetitiva con LPS. Tanto las KC como las células dendríticas hepáticas y las LSEC responden a la concentración de LPS presente en los sinusoides en condiciones fisiológicas (100 pg/ml a 1 ng/ml)¹⁴⁸ con la liberación de citoquinas (IL-10, TGF- β) y de otros mediadores anti-inflamatorios como prostaglandina E2 (PGE2) y ácido retinoico^{132,149}. Además, en estos tipos celulares, la señalización por TLR4 induce una regulación negativa que inhibe la traslocación al núcleo del factor de

transcripción NF- κ B, impidiendo así la producción de mediadores pro-inflamatorios tras el reconocimiento de LPS¹⁴⁹. Este mecanismo no repercute en la capacidad endocítica del hígado, lo que asegura la continua captación de PAMPs de la circulación hepática sin inducir inflamación. De esta forma, la remoción de la sangre de componentes provenientes del intestino protege al resto del cuerpo de la activación inmune excesiva, al tiempo que influencia el entorno inmunológico del hígado. En cambio, en condiciones de infección, el hígado elimina bacterias y otros patógenos opsonizados, y responde a nivel innato en forma acorde para promover la eliminación de dichos patógenos¹⁴⁰.

1.4.4.2 Respuestas inmunes adaptativas: tolerancia hepática

El hígado es considerado un órgano linfoide secundario, ya que constituye un sitio importante para la activación primaria de linfocitos T. Sin embargo, el hígado es un órgano linfoide secundario no convencional. En condiciones basales, la activación primaria de linfocitos T en el hígado conduce a la generación de tolerancia inmunológica¹⁵⁰. La tolerancia inmunológica es el condicionamiento del sistema inmune adaptativo para no montar respuestas efectoras frente a antígenos específicos. En condiciones basales, en el hígado se induce tolerancia a microorganismos comensales y componentes de la dieta que llegan a este órgano desde la circulación portal^{129,132}.

La capacidad tolerogénica del hígado fue descrita por primera vez en experimentos realizados en cerdos, en los que el trasplante de tejido hepático alogeneico protegió del rechazo el trasplante de un segundo tejido del mismo donante¹⁵¹. Desde entonces varios estudios han demostrado la capacidad del hígado de tolerizar frente a los antígenos dietarios, microflora y de trasplantes. En modelos de experimentación animal se observó que cuando se administran antígenos alimentarios vía oral, pero se evita que estos alcancen la circulación hepática, se inhibe el desarrollo de tolerancia a dichos antígenos¹⁵². La inducción de tolerancia no solo impacta a nivel local, sino que tiene un componente sistémico. Así, en un modelo animal de esclerosis múltiple en el que se indujo la expresión ectópica de un auto-antígeno neuronal en hepatocitos, se observó la inducción de Treg específicas para el antígeno neuronal, que protegieron del desarrollo de la enfermedad¹⁵³.

En condiciones basales, en el hígado se promueve una supresión de las respuestas adaptativas efectoras. Dicha supresión está mediada por diversos mecanismos que se suman a los descritos previamente a nivel de la respuesta inmune innata, ejercidos tanto por APC convencionales (CD, KC) como no convencionales (LSEC, hepatocitos, células estrelladas). Entre estos mecanismos destacan la baja expresión en las APC de moléculas de MHC-I/II y de moléculas co-estimuladoras, lo que hace que estas células tengan una baja capacidad estimuladora. Además, tanto las KC como las CD hepáticas expresan las enzimas arginasa-1 e indol-amina 2,3-dioxigenasa (IDO), las cuales, al remover del medio a los aminoácidos arginina y triptófano respectivamente, regulan negativamente la proliferación de linfocitos T¹³². Otra característica de varias APC hepáticas es su capacidad de realizar presentación cruzada. Así, las CD, los hepatocitos, LSEC y las células estrelladas pueden presentar antígenos endocitados en contexto de moléculas de MHC-I además de MHC-II, lo que permite la tolerización de linfocitos T CD8⁺ además de linfocitos T CD4⁺. Usualmente, esta tolerización está dirigida a antígenos dietarios y de la microflora^{129,154}.

Otro aspecto muy relevante en la inducción de tolerogénesis hepática es la expresión del co-inhibidor PD-L1 por todas las APC hepáticas. Esta expresión es constitutiva pero además puede ser inducida por la señalización por receptores TLRs¹⁵⁵. Así, en condiciones basales, en el hígado la presentación de antígeno ocurre en ausencia de co-estimulación y presencia de señales inhibitorias, con la interacción de PD-L1 en las APC con PD-1 en los linfocitos T. Esto, sumado a la expresión de mediadores anti-inflamatorios (IL-10, TGF-β, PGE-2) lleva a la inhibición, inactivación y/o delección de clones de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ efectoras, así como a la inducción o expansión de Treg^{129,142,156}.

Las KC, de especial interés en la presente Tesis, juegan un papel central en la inducción de tolerancia hepática a diversos antígenos (dietarios, microflora, transplantes), así como a patógenos que se alojan en el hígado. En condiciones basales, la presentación en MHC-II por KC da lugar a la inducción de Treg que expresan IL-10, las cuales tienen efectos a nivel de la respuesta inmune sistémica¹⁵⁶.

1.5 Hipótesis de trabajo de esta Tesis

Durante el crecimiento de la hidátide se liberan materiales de la LL, que en infecciones en humanos se han detectado tanto en el sitio de infección como en ganglios drenantes⁹¹. Estos materiales liberados son ricos en mucinas que presentan abundantes residuos terminales de Gal, que potencialmente podrían interactuar con lectinas del hospedero que presentan esta especificidad, como pueden ser MGL, ASGR o Clec4F. Clec4F en una versión recombinante dimérica y en un ensayo *in vitro*, se unió a glicanos de la LL de *E. granulosus*, así como la de *E. multilocularis*¹⁰⁵.

Ancestralmente las fases larvianas del antepasado de *Echinococcus spp.* se alojaban en el hígado de roedores^{70,157}. En roedores, Clec4F se expresa casi exclusivamente en las KC, células que son basalmente tolerogénicas. Así, se puede postular que los azúcares de la LL habrían sido seleccionados evolutivamente para ser reconocidos por Clec4F y captados por las KC, lo que habría sido beneficioso para el parásito. Esta interacción Clec4F-LL podría mantenerse en mamíferos (bovinos y otros ungulados) que tienen Clec4F funcional como lectina y que son actuales hospederos para *E. granulosus*, con la complejidad de que en estos animales la expresión del receptor también ocurre fuera del hígado, posiblemente en poblaciones de macrófagos de los órganos linfoides convencionales.

Entonces, la hipótesis concreta de esta Tesis es que durante la equinococosis quística experimental se liberan materiales de las mucinas de la LL, que alcanzan la circulación y son luego captados por las KC mediante Clec4F. Esta captación podría condicionar la respuesta inmune del hospedero en pos de favorecer el establecimiento de *E. granulosus* larvario.

Para abordar esta hipótesis, en la presente Tesis se trabajó *in vivo* en ratones, analizando cambios dependientes de Clec4F nativo, incluyendo en particular la captación de materiales de LL en las KC. Este trabajo incluyó experimentos con el modelo de infección experimental intraperitoneal, en los que se buscó determinar, además de si los

materiales de la LL son captados por KC en forma dependiente de Clec4F, si esta posible interacción LL condicionaba la respuesta inmune frente al parásito.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general:

El objetivo general de la presente Tesis fue investigar la interacción de las mucinas de la LL de *E. granulosus s.s.* con Clec4F nativo, y evaluar los posibles efectos de dicha interacción.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Poner a punto un modelo de macrófagos apropiado para estudiar *in vitro* la interacción de Clec4F con la LL de *E. granulosus*.
2. Estudiar *in vivo* el papel de Clec4F en la captación de materiales de la LL exógenos.
 - a. Evaluar el papel de Clec4F en la internalización de materiales de la LL (solubles y particulados) por las KC.
 - b. Evaluar el impacto de Clec4F en la biodistribución de los materiales de la LL inyectados intraperitonealmente.
 - c. Determinar si la interacción LL-Clec4F induce cambios fenotípicos en las KC.
3. Estudiar *in vivo* el papel de Clec4F en la equinocosis experimental.
 - a. Evaluar el papel de Clec4F en la internalización de los materiales de la LL liberados durante la infección experimental.
 - b. Evaluar el impacto de Clec4F en la biodistribución de los materiales de la LL liberados durante la infección experimental.
 - c. Evaluar el papel de Clec4F en las respuestas inmunes locales, sistémicas y hepáticas, en la infección experimental.

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales de trabajo

3.1.1 Material parasitario

La fuente de material parasitario, tanto de los materiales de partida para las preparaciones de LL solubilizadas o particuladas como de los protoscólices (PSC) vivos para realizar las infecciones experimentales, fueron hidátides fértiles de *E. granulosus sensu stricto*, obtenidas de infecciones naturales en ganado bovino en el país. Las muestras parasitarias fueron genotipadas por amplificación y secuenciación del gen de la enzima citocromo c oxidasa mitocondrial de acuerdo a Cucher *et al.* 2015²⁷. Todas las muestras analizadas en la presente Tesis correspondían a los genotipos G1 o G3.

3.1.1.1 Preparación de materiales de la LL

A lo largo de la Tesis se emplearon distintas preparaciones de la LL, solubles o particuladas, para cuya preparación se partió de paredes de hidátides obtenidas de hospederos bovinos. En este tipo de material, la LL constituye el componente abrumadoramente mayoritario, despreciándose el aporte de la GL⁸⁰. Las paredes fueron extensamente lavadas con una solución de NaCl 2M para eliminar las proteínas del hospedero adsorbidas, y luego lavadas con agua para remover el NaCl. A continuación, se deshidrataron por incubaciones con etanol 95% v/v seguido de acetona⁵⁰. Luego se pulverizó el material empleando mortero y se redujo el tamaño de partícula por molienda entre dos placas de vidrio esmerilados⁹³. A partir de este paso del procesamiento, se realizaron los tratamientos del material en condiciones de esterilidad, es decir en cámara de flujo laminar, usando material estéril y soluciones libres de endotoxinas. El pulverizado fino resultante fue re-hidratado en PBS conteniendo EDTA 30 mM (1 mL cada 2 mg de masa seca de paredes de hidátides) para disolver los depósitos de InsP_6 cálcico y por lo tanto obtener una preparación de LL conteniendo la malla de mucinas como su componente estructural principal⁴⁰. Se

traspasó la suspensión de LL a tubo de 50 mL para realizar diez lavados con PBS, por centrifugación a 3500 g por 5 minutos, para remover el EDTA, con un cociente de volúmenes, en cada lavado, de 30:1.

3.1.1.1.1 Preparación de material de LL solubilizado (sLL)

Tras la remoción de los depósitos de InsP_6 cálcico, se generaron distintos materiales de sLL: con residuos terminales monosacáridos oxidados (sLL- IO_4), sometido a tratamiento control del tratamiento de la oxidación (sLL- BH_4) y sLL sin tratar, así como los materiales anteriores conjugados a biotina. Para obtener sLL- IO_4 se lavó la suspensión de LL con un volumen 10x del precipitado obtenido tras centrifugación de la suspensión de partículas, con una solución de acetato de sodio 50 mM pH 4,5. Luego de centrifugar a 3500 g durante 5 minutos, se trató la suspensión de LL con 10 volúmenes de una solución de NaIO_4 10 mM (en 50 mM de acetato de sodio pH 4,5), durante 1 hora, con agitación a temperatura ambiente. A continuación, se agregó igual volumen que el ya presente en el tubo de una solución de NaBH_4 200 mM en agua y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. El NaBH_4 reduce los aldehídos reactivos generados por la oxidación con NaIO_4 a alcoholes. El material sometido a tratamiento control del de la oxidación de glicanos, sLL- BH_4 , fue incubado solamente con NaBH_4 . Por su parte, el material de LL sin tratar se mantuvo siempre en PBS. Finalizado este tratamiento, se eliminaron el NaIO_4 y/o el NaBH_4 realizando diez lavados del material con PBS, por centrifugación, aplicando un cociente de volúmenes de 30:1 por lavado. Para marcar las muestras de sLL con biotina, se incubó las mismas con una solución de N-hidroxisuccinimida-biotina (NHS-biotina; a una relación de 10 μg por mg de masa seca de LL) en PBS O/N (toda la noche, del inglés *overnight*), a 4°C y con agitación. Se removió el exceso de biotina por lavados sucesivos con PBS por centrifugación. Una fracción de cada material generado fue lavado con agua para remover las sales del PBS y liofilizado, para así determinar la masa seca de LL en cada una de las muestras⁹³. Luego de realizados los tratamientos, se solubilizaron las muestras de LL por sonicación, en condiciones de esterilidad, se centrifugaron a 100000 g durante una hora a 4°C, y se almacenaron las fracciones solubles en PBS con antibiótico/antimicótico penicilina-estreptomicina (100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B) (Gibco), por no más de 12 meses a 4°C. La experiencia previa muestra que el material así producido y almacenado está libre de cantidades biológicamente significativas de endotoxinas⁹³.

3.1.1.1.2 Preparación de material de LL particulado (pLL)

Se generaron preparaciones particuladas de la LL, en sus variantes con los depósitos de InsP_6 cálcico (wpLL, del inglés *whole pLL*, o sea pLL completo) y sin estos depósitos (pLL); ambas preparaciones de LL fueron sometidas al tratamiento control con NaBH_4 . Para generar wpLL se partió de una suspensión de LL tratada con NaBH_4 , preparada como se describe en el punto anterior, que no fue tratada con EDTA, y en todos los pasos durante la preparación del material se adicionó CaCl_2 0,1 mM a las soluciones usadas, para preservar la integridad de los depósitos de InsP_6 cálcico⁶⁶. Para obtener pLL se partió de la suspensión de LL tratada con NaBH_4 , a la cual luego de los lavados para remover el NaBH_4 , se la sometió a tratamiento con PBS-EDTA, también como se describe en el punto anterior, sin adicionar CaCl_2 en los pasos posteriores. Tanto para preparar wpLL como pLL se trabajó con soluciones libres de endotoxinas, y luego de lavar exhaustivamente con PBS, se filtró de forma consecutiva por mallas de serigrafía con poros de 85, 45 y 23 µm⁹³. Las muestras de wpLL o pLL se almacenaron en PBS con CaCl_2 0,1 mM con antibiótico/antimicótico, por no más de 6 meses a 4°C.

3.1.1.2 Obtención de PSC

Se obtuvieron PSC de órganos (generalmente pulmones) de bovinos infectados naturalmente, provenientes de establecimientos locales. Los órganos fueron procesados en una zona limpia del laboratorio. En primer lugar, se limpió con alcohol 70 % v/v la superficie del órgano que contenía los quistes hidáticos, y se realizó un corte en la pared de estos últimos para volcar el contenido en tubos estériles (líquido hidático con vesículas prolíferas). A partir del siguiente paso, se procedió a trabajar en cámara de flujo laminar. Se tomaron las vesículas prolíferas y mediante tres pasajes sucesivos de las mismas por jeringas con agujas 21G, se liberaron los PSC. Los PSC se lavaron exhaustivamente con una solución salina libre de endotoxinas para separar los parásitos

vivos de los muertos (cuya decantación es más lenta que la de los PSC vivos). Se determinó la viabilidad de la suspensión final de PSC por el método de exclusión de la eosina. Solamente se utilizaron lotes de PSC con una viabilidad mayor al 95%.

3.1.2 Validación de sondas empleadas para la detección de materiales de la LL por citometría de flujo

Además de contar con materiales de la LL biotinilados para su posterior detección empleando estreptavidina conjugada a un fluoróforo (sección 3.1.1.1), era necesario poder detectar los materiales de la LL sin marcar, para poder estudiar la captación de dichos materiales en el contexto de la infección experimental. Para esto se contaba con la lectina vegetal del maní PNA (del inglés, *Peanut Agglutinin*) (Vector Laboratories), el anticuerpo monoclonal de ratón E492, y una versión recombinante de Clec4F de ratón. El anticuerpo monoclonal E492 y la proteína Clec4F recombinante fueron cedidos gentilmente por el Dr. Gustavo Mourglia (Área Inmunología, DepBio, Facultad de Química, UdelaR) y el Dr. Shie-Liang Hsieh (Genomics Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan), respectivamente. La PNA reconoce el motivo Gal β 1-3-GalNAc α 1, es decir el *O*-glicano mucínico no decorado *core* 1 o antígeno T⁴⁹. Este motivo se encuentra altamente representado en la LL de *E. granulosus*⁵⁷. La segunda posible sonda, el anticuerpo E492, fue desarrollado contra el estadio PSC del parásito¹⁵⁸, y reconoce glicanos mucínicos de la LL de *E. multilocularis*⁷⁷ así como glicanos sintéticos de la LL de *E. granulosus*¹⁵⁹. La tercera potencial sonda era una versión recombinante de Clec4F, en la cual el dominio lectina se encuentra fusionado a fragmento Fc de IgG1 humana (y por lo tanto en presentación dimérica)¹⁰⁵; esta sonda se une a mucinas de LL de *E. granulosus* y *E. multilocularis*¹⁰⁵. Se evaluó el nivel de reactividad de las tres sondas mencionadas con los tejidos del hospedero, así como el potencial de las mismas para detectar los materiales de la LL en experimentos *in vivo*, en particular en la fracción no parenquimal hepática (FNPH). Para esto, se inyectaron ratones C57BL/6 WT con 200 μ g de sLL-BH₄ o con PBS como control de vehículo, por vía intravenosa (con aguja 30g), y a las 22 horas se evaluó la señal de las sondas en células de la FNPH permeabilizadas, por citometría de flujo. Se analizó la marca de cada una de las 3 sondas en las LSEC, KC, células CD11b⁺ no identificadas como KC (llamadas “células CD11b⁺ no KC”, ver Figura

4.3 estrategia de clasificación en citometría de flujo) y todas las células restantes de origen hematopoyético (células CD45⁺CD11b⁻F4/80⁻), de los animales controles o inyectados con sLL, usando las diluciones y reactivos secundarios mostrados en la Tabla 3.1.

Sonda	Dilución final/ concentración	Clon	Proveedor	Reactivo secundario
PNA-biotina	1/1500	-	Vector Laboratories	Estreptavidina-PE
E492-biotina	1/500	E492 (IgG3 monoclonal de ratón)	Preparado en el laboratorio	Estreptavidina-PE
Clec4F recombinante	4,6 µg/ml	-	Preparado por colaboradores	Anti-Ig humana de cabra FITC
Estreptavidina-PE (usada como sonda primaria para detectar sLL-biotina o como secundaria para detectar PNA/E492-biotina)	1/200	-	eBioscience	-
Anti-Ig humana de cabra FITC	1/75	-	Sigma	-

Tabla 3.1. Sondas utilizadas en citometría de flujo para la detección de materiales de la LL. Se detallan los anticuerpos y sondas utilizadas en citometría de flujo para la detección de materiales de la LL en la FNPH.

3.1.3 Modelos animales empleados

3.1.3.1 Generación de línea de ratón deficiente en Clec4F (*Clec4f*^{-/-})

A pesar de que se contaba con colaboradores en Taiwán que ya tenían disponible una línea de ratones *Clec4f*^{-/-127}, el costo de importación de esos ratones a Uruguay, así como su re-derivación, era lo suficientemente elevado como para que resultara económicamente conveniente generar una línea de ratones *Clec4f*^{-/-} de novo en la cepa de ratones C57BL/6, mediante la tecnología de CRISPR-Cas9. Esta producción fue realizada en el laboratorio libre de patógenos de la Unidad de Biotecnología Animal (UBAL) del Institut Pasteur de Montevideo. Todos los procedimientos correspondientes fueron realizados por personal de la UBAL, en un formato de colaboración con nuestro

grupo. Se indujo una mutación que da lugar a la delección de una secuencia de 8 pb (5'-CAGGACCC-3') ubicada en el segundo exón y el primer intrón del gen, lo que conduce a la obtención de una proteína que carece de 480 aminoácidos. Brevemente, se microinyectó una mezcla de 25 ng/ μ l de ARNm de Cas9 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) y 15 ng/ μ l de cada guía de ARN (Synthego, Menlo Park, CA, USA) diluidos en tampón de microinyección (Tris 5 mM-HCl, pH 7.4, y EDTA 0,1 mM). Los embriones viables se cultivaron toda la noche en microgotas de medio M16 (Sigma) con 5 % CO₂ a 37°C. Al día siguiente, se transfirieron los embriones de dos células a los oviductos de hembras B6DF1 pseudopreñadas (aproximadamente 20 embriones/hembra). El diagnóstico de preñez fue realizado por inspección visual a las dos semanas de la transferencia de embriones. Se genotiparon las crías a los 21 días del nacimiento y se mantuvieron a los animales mutantes como fundadores. Se confirmó la modificación genética de la descendencia por secuenciación Sanger. Se logró establecer la homocigosis en la F3 y así obtener la línea de ratones *Clec4f*^{-/-}. Los cebadores empleados para la amplificación del locus fueron 5-TCTTTATGATCGCACCCACA-3' y 5'-TCCATTCTCGAGAGCCATCT-3'. Se confirmó la ausencia de Clec4F en los animales *Clec4f*^{-/-} a nivel de proteína por citometría de flujo de la FNPH y tinción post-permeabilización de Clec4F.

3.1.3.2 Fuente de ratones de tipo silvestre y mantenimiento de los mismos

Los ratones de la línea *Clec4f*^{-/-} y ratones C57BL/6 de tipo silvestre (WT, del inglés *wild-type*), que se usaron como controles en los experimentos que involucraban a los primeros, fueron criados en paralelo en el Bioterio del Institut Pasteur de Montevideo; luego de cinco semanas de edad, se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Higiene, en cajas en las que co-habitaron individuos de ambos genotipos durante al menos tres semanas, para equilibrar la microflora. Los ratones WT Balb/c, hembras, fueron obtenidos de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, y se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Higiene, en cajas con viruta y agua autoclavadas y con tapas con filtro. Durante el tiempo que los animales fueron mantenidos en el Bioterio, estuvieron sin restricción en la cantidad de comida y de agua provistas. Se realizaron los experimentos con individuos de entre 8 a 14 semanas de edad.

3.1.4 Mantenimiento de líneas celulares

Las células HEK 293T (ATCC; CRL-3216) y RAW 264.7 (ATCC, TIB-71) fueron amablemente cedidas por los Dres. Hugo Peluffo y Mariela Bolatti del Institut Pasteur de Montevideo, respectivamente. La línea celular J774A.1 (ATCC, TIB-67) se mantenía ya en *stock* en la Cátedra de Inmunología. Todas las líneas se mantuvieron en medio DMEM alta glucosa (Applichem A1316,9050) en presencia de 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) (inactivado por calor para el cultivo de J774A.1 y de RAW 264.7), en presencia de antibiótico/antimicótico (DMEM completo).

Las células HEK 293T fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 70-90 %, tras lo cual fueron incubadas en PBS-Tripsina-EDTA durante 3-5 minutos en incubador de cultivo a 37°C con 5 % CO₂ para su disgregación. Luego se neutralizó la tripsina por agregado del mismo volumen de medio con 10 % v/v suero fetal bovino (SFB), y se realizaron pasajes a nuevas botellas para el sub-cultivo. Por su parte, las células J774A.1 y las RAW 264.7 se mantuvieron hasta alcanzar una confluencia del 70-90 % y luego se las despegó del frasco de cultivo mediante el uso de raspador (*scraper*) en el mismo medio en el que se encontraban en el cultivo. Se tomó un volumen determinado de medio con células y se realizaron pasajes a nuevas botellas.

3.1.5 Preparación de reactivos para la producción de partículas lentivirales (LV)

3.1.5.1 Consideraciones generales acerca de los vectores lentivirales

Para realizar ensayos para la caracterización funcional de Clec4F se intentó generar una línea de macrófagos que expresaran el receptor. Dada la conocida dificultad de transfectar macrófagos¹⁶⁰, se optó por una estrategia de transducción lentiviral, para la cual se contaba con la colaboración del MSc. Diego Pérez, del grupo del Dr. Gualberto González.

Los vectores lentivirales (LV, del inglés *lentiviral vectors*), en su mayoría basados en el HIV-1 (Virus de la Inmunodeficiencia Humana-1), son capaces de transmitir la

información desde su genoma hacia la célula blanco, en lo que se denomina *delivery* de genes. Estos vectores son ampliamente utilizados para generar líneas celulares que expresen un transgen determinado de forma estable^{161,162}.

Generalmente, la producción de LV conlleva una primera etapa de transfección de las células productoras con diferentes plásmidos. Posteriormente, los LV se ensamblan y brotan de la célula productora acumulándose en el sobrenadante celular, de donde son purificados/concentrados. Estas partículas son capaces de transducir una célula blanco, en la cual el gen codificado puede ser transcrito y traducido¹⁶³. Los LV se clasifican en distintas generaciones (primera a cuarta) de acuerdo al nivel de bioseguridad que presentan. En la presente Tesis se produjeron LV de segunda generación, y para su producción se transfectaron células productoras (HEK 293T) con tres plásmidos distintos, de transferencia, de empaquetamiento y de envoltura. El plásmido de transferencia codifica el transgen de interés y elementos necesarios para la regulación de la expresión del mismo¹⁶⁴. Los plásmidos de empaquetamiento y de envoltura, como sus nombres lo indican, codifican para los demás componentes necesarios para la producción de las partículas de LV, como son las proteínas para la retrotranscripción e integración del genoma del LV al genoma de la célula blanco, proteínas de la cápside y de la envoltura. Además, los LV producidos contenían en su envoltura a la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G, del inglés *vesicular stomatitis virus G protein*), lo que les confiere la capacidad de transducir un muy amplio rango de tipos celulares, con altas tasas de transducción¹⁶⁵. A estos LV se les denomina pseudotipados por VSV-G.

En la presente Tesis se emplearon dos variantes para la producción de LV para expresión de Clec4F. Ambas variantes implicaron la producción de LV pseudotipados por VSV-G (VSV-G-LV), pero se diferenciaron en los plásmidos de transferencia empleados para la producción de las partículas de LV. En la primera variante se contaba con un plásmido de transferencia sin marcador de selección para la expresión de Clec4F y con el mismo plásmido, pero para la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP), usado como control; con ambas preparaciones de LV se transdujo la línea celular de macrófagos de ratón J774A.1. En la segunda variante se utilizó un plásmido de transferencia con

resistencia a puromicina, además del gen de Clec4F. Con esta preparación se transdujo la línea de macrófagos de ratón RAW 264.7. No se contaba con una preparación de LV para expresión de GFP con esta variante. En ambas variantes se transdujeron también cultivos de HEK 293T como control, ya que esta línea es altamente susceptible a la transducción.

3.1.5.2 Plásmidos para la generación de LV

Para la producción de VSV-G-LV se utilizaron tres tipos de plásmidos:

- (i) plásmido codificante para la envoltura VSV-G: pMDG.2
- (ii) plásmido de empaquetamiento: p8.91
- (iii) plásmidos de transferencia: pSIN-SFFV-GFP o pSIN-SFFV-Clec4F (primera variante de transducción, sin marcador de selección), o pLJM1-Clec4F (segunda variante de transducción, con marcador de selección).

Los plásmidos pMDG.2, p8.91, pSIN-SFFV y pSIN-SFFV-GFP fueron provistos por la colaboración con el grupo del Dr. G. González. El pLJM1 fue amablemente donado por la Dra. Florencia Irigoín (Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur de Montevideo). Cabe destacar que el pLJM1 cedido es una versión modificada del plásmido original de Addgene, y su sitio de clonado múltiple, a diferencia del caso del plásmido original, contiene los siguientes sitios de corte: NheI, AgeI, KpnI, XbaI, Sall, NsiI, PstI, MluI, XmaI, EcoRI (en el orden indicado).

3.1.5.2.1 Producción, expansión y purificación de plásmidos

Los plásmidos adquiridos y generados durante la presente Tesis fueron amplificados mediante transformación por electroporación de bacterias de la cepa *E. coli* DH5 α (Thermo Scientific), que no posee endonucleasas ni recombinasas. Para esto se tomó 1 μ l del producto de ligación o del plásmido correspondiente y se electroporaron en 25 μ l de células DH5 α electrocompetentes. Posteriormente se agregó 1 mL de medio de recuperación (del inglés, *Super Optimal broth with Catabolite repression, SOC*) y se incubó durante 45 minutos a 37°C con agitación a 250 rpm. Luego se realizaron

diluciones seriadas del cultivo y se plaquearon las mismas en placas de Luria Bertani (LB)-agar-Ampicilina.

Para generar pequeñas cantidades de los plásmidos para digestiones, se tomó una colonia transformada y se la incubó O/N a 37°C, con agitación en 3-4 mL de LB-Ampicilina. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo a 5000 g por 5 minutos y se realizó la extracción de ADN plasmídico utilizando el *kit* de *mini-prep* (Qiagen 27104). A modo de generar *stock* para las transfecciones, para cada plásmido, se tomó una colonia transformada y se la incubó 8 horas en 3-4 mL de LB-Ampicilina. Posteriormente, se tomó una alícuota de este cultivo y se lo incubó O/N a 37°C y con agitación en 250-500 mL de LB-Ampicilina. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo durante 20 minutos a 5000 g y se extrajo el ADN plasmídico mediante el *kit maxi-prep endo-free* (Thermo Scientific K0861).

3.1.5.2.2 Producción del plásmido de transferencia pSIN-SFFV-Clec4F: para primera variante de transducción

Inicialmente se tomó la secuencia de Clec4F de ratón de la base de datos GenBank (NM_016751.3) y se optimizó la misma para la expresión de la proteína en células eucariotas. La secuencia optimizada se envió a sintetizar en el vector pUC57 a *General Biosystems*.

El plásmido pUC57 con el gen sintético de Clec4F se resuspendió en 100 µL de agua calidad biología molecular. Se tomó 1 µL de la construcción para transformar bacterias de la cepa *E. coli* DH5α (Thermo Scientific), como se mencionó previamente. Las bacterias se plaquearon en placas de LB agar-Ampicilina (resistencia otorgada por el pUC57) y se crecieron O/N a 37°C. Al día siguiente se realizó la *mini-prep* para extracción de ADN plasmídico. A continuación, se digirieron los plásmidos pUC57-Clec4F y el pSIN-SFFV vacío con las enzimas de restricción Agel (NEB, R3552S) y Sall (Invitrogen ER0642) durante 4 horas a 37°C. Los productos de digestión se corrieron en un gel de agarosa al 1 % m/v y se purificaron el plásmido pSIN-SFFV y el inserto para expresión de Clec4F digeridos, mediante un *kit* de extracción de gel (Qiagen 28704). Luego se procedió a la

ligación del plásmido pSIN-SFFV con el inserto, empleando una relación de 3:1 (inserto:vector), y se incubó la reacción a 22°C durante 1 hora con la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific), se detuvo la misma por incubación a 65°C por 10 minutos. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5α con las ligaciones, así como con el control de re-ligación, y tras cultivo O/N, se extrajo el ADN plasmídico. Se verificó la generación del plásmido recombinante pSIN-SFFV-Clec4F (ver estructura en Figura 3.1) por digestión con enzimas de restricción (BstXI y Sall) cuyos productos de digestión permitían distinguirlo del pSIN-SFFV vacío y del pSINSFFV-GFP. Se confirmó mediante secuenciación la obtención del plásmido de transferencia pSIN-SFFV-Clec4F.

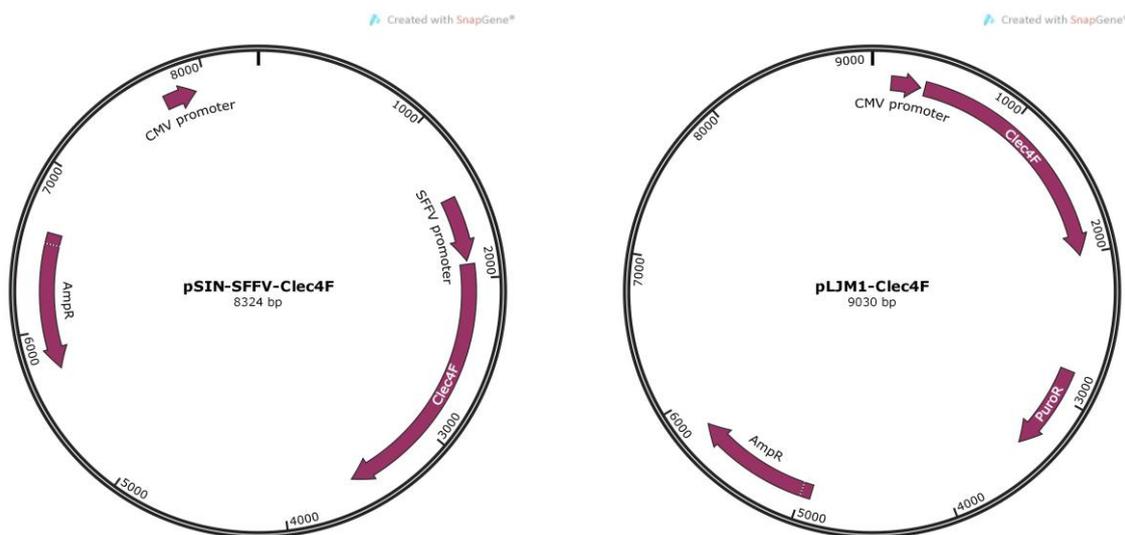


Figura 3.1. Esquema de los plásmidos codificantes para Clec4F. Se muestran esquemas de los plásmidos de transferencia generados para la expresión de Clec4F empleados para generar LV con las dos estrategias mencionadas en la sección Materiales y Métodos. Ambos plásmidos codifican para el gen de resistencia a ampicilina que les permite ser seleccionados cuando se preparan en cultivos de bacterias. Además, en ambos, la expresión de Clec4F está bajo la expresión del promotor CMV. Por su parte el pLJM1 codifica también para el gen de la resistencia a puromicina, lo que permite seleccionar en el cultivo eucariota las células transfectadas/transducidas.

3.1.5.2.3 Producción del plásmido de transferencia pLJM1-Clec4F: para segunda variante de transducción

El plásmido de transferencia de la segunda variante de transducción empleada en esta Tesis codificaba, además de Clec4F, para resistencia a puromicina. Como se mencionó previamente, para generar esta construcción se partió de una versión modificada del

plásmido pLJM1 de Addgene, generado en el Laboratorio de la Dra. Florencia Irigoín. En primer lugar, se amplificó el gen de Clec4F desde el pUC57-Clec4F mediante PCR utilizando la enzima Pfu (Thermo Scientific) y siguiendo el protocolo del proveedor. A su vez se diseñaron los cebadores FWD-Mlul y REV-Sall (ver Tabla 3.2), que se encontraban flanqueados en sus extremos 5' por sitios de restricción para las enzimas Mlul y Sall, respectivamente, y que permitían amplificar el inserto de Clec4F desde el pUC57. Se verificó que el producto de PCR tuviera el tamaño adecuado mediante corrida de la muestra en gel de agarosa al 1 % m/v. Los productos de PCR se limpiaron mediante un *kit* de purificación (Qiagen 28104) y se digirieron con las enzimas de restricción Mlul y Sall en el mismo paso, dado que a pesar de ser de distintos proveedores actúan en tampones con la misma composición y con el mismo protocolo, es decir a 37°C durante 4 horas. Los productos de digestión se corrieron en un gel de agarosa 1 % m/v y se purificaron desde el mismo. Luego se ligaron al plásmido pLJM1 previamente digerido con las mismas enzimas. Para realizar la ligación se utilizó una relación de 3:1 (inserto:vector) y se incubó con la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific), empleando el mismo protocolo mencionado previamente. Nuevamente, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α con las ligaciones, así como con el control de re-ligación, y tras cultivo O/N, se extrajo el ADN plasmídico mediante *kit* de *mini-prep* (Qiagen). Se verificó la generación del plásmido recombinante pLJM1-Clec4F por digestión con enzimas de restricción (Mlul y Sall) (ver estructura en Figura 3.1). Se confirmó mediante secuenciación la obtención del plásmido de transferencia pLJM1-Clec4F.

Cebador	Secuencia
FWD-Sall	5'-ATTAAG <u>TCGACG</u> CCACCATGAAGGAGGCCG-3'
REV-Mlul	5'-TTAAT <u>ACGCGT</u> CTAGCCTACTCTGGCCGAG-3'

Tabla 3.2. Secuencia de los cebadores utilizados para generar el plásmido de transferencia pLJM1-Clec4F. Se muestran las secuencias de los cebadores empleados para clonar el gen de Clec4F desde pUC57-Clec4F con los sitios de restricción adicionados para Sall y Mlul, subrayados para el cebador *forward* y el *reverse*, respectivamente.

3.1.5.3 Producción de VSV-G-LVs

3.1.5.3.1 Primera estrategia de producción de LV: plásmido de transferencia sin marcador de resistencia

Se sembraron 2×10^7 células HEK 293T en frascos de cultivo T-175 en 25 mL de DMEM-completo. Al día siguiente, se transfectaron (solo si se encontraban en un 70-80 % de confluencia) utilizando el reactivo polietilenimina (PEI) (Polysciences Inc) con 35,6 μg de ADN total por frasco, correspondientes a 17,5 μg del plásmido de transferencia pSIN-SFFV-GFP o pSIN-SFFV-Clec4F, 12 μg del plásmido de empaquetamiento p8.91 y 6,1 μg del plásmido de envoltura pMDG.2. Se mezcló en un tubo estéril el volumen necesario de cada solución de ADN con un volumen de medio DMEM sin aditivos, tal de obtener un volumen total de 2,3 mL (mezcla ADN-DMEM). Se homogeneizó brevemente en agitador tipo *vórtex*. En un segundo tubo estéril se mezcló 140 μL de PEI 10 mM con un volumen de medio DMEM sin aditivos hasta un volumen total de 2,2 mL (mezcla PEI-DMEM), se homogeneizó brevemente. A continuación, se agregó rápidamente la mezcla de PEI-DMEM sobre la mezcla de ADN-DMEM, se homogeneizó durante 15 segundos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Durante esta incubación, se cambió el medio de las células por 10 mL de DMEM-15 % v/v SFB, y finalizados los 30 minutos, se agregó la mezcla de transfección (aproximadamente 4,7 mL) mezclando por agitación en cruz o por pipeteo. Entre 4 y 6 horas post-transfección (o al día siguiente), se cambió el medio a 18-20 mL de DMEM-completo. Se colocaron las células en estufa de cultivo a 37°C y 5 % v/v de CO₂. Entre 36 y 48 horas post-transfección, se recogió el sobrenadante (conteniendo LV), se centrifugó el mismo a para eliminar detritos celulares, y se filtró por 0,45 μm . Luego de filtrado se dividió el volumen en tubos para ser concentrados mediante centrifugación. Para esto se agregó suavemente el sobrenadante de cultivo conteniendo LV en el fondo del tubo que contenía 4,5-5,5 mL de PBS-Sacarosa 20 % m/v y se centrifugó durante 24 horas a 4500 g y 4°C. Una vez finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante y se dejó el tubo boca abajo durante 5 minutos sobre una toalla de papel para permitir que se secase. Luego, se agregaron 100 -200 μL de PBS pre-enfriado y se resuspendió el precipitado por pipeteo. Luego se colocaron los tubos en agua-hielo y agitación lenta durante 1-2 horas.

Posteriormente se terminó de resuspender el precipitado por pipeteo y se alicuotó en pequeños volúmenes (10-30 μ L) que fueron conservados a -80°C .

3.1.5.3.2 Segunda estrategia de producción de LV: plásmido de transferencia con marcador de resistencia

Para la producción de LV con la segunda estrategia de transducción empleada en la presente Tesis, se procedió a realizar producción de LV a pequeña escala. Para esto se sembraron $1,2-2 \times 10^6$ células HEK 293T/pocillo en placas de 6 pocillos (Greiner) en 2 mL de DMEM-Completo, en lugar de emplear botellas T175 y cultivar 2×10^7 células HEK 293T. Al día siguiente, se transfectaron (solo si se encontraban en un 70-90 % de confluencia) con 1,92 μ g de ADN total, utilizando 0,96 μ g del plásmido de transferencia pLJM1-Clec4F, 0,63 μ g del plásmido de empaquetamiento p8.91 y 0,34 μ g del plásmido de envoltura pMDG.2.

Para transfectar, se diluyó el ADN en 130 μ L de DMEM sin aditivos y se agregaron 8 μ L de PEI 10 mM a 120 μ L de DMEM sin aditivos. Se tomó la mezcla PEI-DMEM y se agregó sobre la mezcla ADN-DMEM, tras lo cual se homogeneizó inmediatamente por 15 segundos. Esta mezcla PEI- ADN- DMEM se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, mientras se realizó un cambio de medio a las células por 800 μ L de DMEM-15 % v/v de SFB. Una vez finalizada la incubación, se agregó la mezcla PEI- ADN-DMEM a las células y se homogeneizó. A las 36-48 horas post-transfección, se recogió el sobrenadante conteniendo las partículas de LV, y se utilizó el mismo directamente para transducir las células blanco.

3.2 Experimentos *in vitro*

3.2.1 Transducción de cultivos celulares para expresión estable de Clec4F

Para ambas estrategias de producción de LV empleadas en la presente Tesis, se evaluaron las distintas preparaciones de VSV-G-LV por transducción estática de cultivos de células susceptibles (HEK 293T), además de las líneas de macrófagos de interés

(J774A.1 y RAW 264.7). Posteriormente se evaluó la expresión del transgen por citometría de flujo y/o *western blot*.

3.2.1.1 Primera estrategia: transducción con LV-Clec4F y LV-GFP, sin marcador de selección

Se plaquearon 4×10^4 células HEK 293T o J774A.1 en 100 μ L por pocillo en placas estériles de 96-pocillos de fondo plano (Greiner). Al día siguiente se realizaron diluciones seriadas (1/50 a 1/5000) de los LV-Clec4F o LV-GFP en medio completo sin antibiótico/antimicótico, se agregaron fracciones de 50 μ L de dichas diluciones a los pocillos con células, y se incubó durante 2 horas; luego se agregaron 150 μ L por tubo de medio completo sin antibiótico. Se incubó el cultivo y a las 72 horas post-transducción se evaluó la expresión de GFP por citometría de flujo, y la de Clec4F citometría de flujo y/o *western blot*.

3.2.1.2 Segunda estrategia: transducción con LV-Clec4F con marcador de selección (resistencia a puromicina)

Se plaquearon $1,2 \times 10^6$ células HEK 293T o RAW 264.7 en 2 mL de medio completo sin antibiótico/antimicótico, por pocillo de placas estériles de 6 pocillos (Greiner). Por otro lado, se coordinaron los ensayos de transfección-transducción, de forma tal que las partículas de LV estuviesen prontas una vez que las células a transducir estuvieran en la confluencia deseada. A diferencia del protocolo de transducción comentado previamente, en este caso se tomó el sobrenadante de cultivo de las HEK 293T transfectadas, conteniendo los LV, y se lo incubó directamente con los cultivos a transducir, luego de remover de los mismos los detritos celulares por centrifugación a 300 g durante 10 minutos. Para no incubar las células a transducir con un medio empobrecido en nutrientes y acidificado, la transducción se hizo en dos etapas consecutivas, en cada una de las cuales se mezcló un volumen correspondiente a 2/3 del volumen del sobrenadante con 1/3 de volumen de DMEM con 10 % v/v SFB fresco, en incubaciones de 2 horas cada una hasta utilizar todo el volumen del sobrenadante conteniendo LV. Finalizada la última incubación se dejaron transcurrir 72 horas y se seleccionaron las células transducidas por el agregado de puromicina (Sigma, P8833) a

los cultivos de HEK 293T y de RAW 264.7 (2 y 5 µg/ml, respectivamente), durante 72 horas adicionales. Las concentraciones de puromicina empleadas en ambos tipos celulares fueron determinadas realizando ensayos de curvas de muerte, en las cuales se incubaron las células con concentraciones del antibiótico entre 0 y 20 µg/ml, y se determinaron las concentraciones mínimas, para cada tipo celular, que causaban la muerte del 100 % de las células en cultivo.

3.2.1.3 Transfección de cultivos para expresión transitoria de Clec4F

En paralelo a los ensayos de transducción se realizó un intento de transfección directa de un cultivo de RAW 264.7. Para ello se plaquearon $1,2 \times 10^6$ células en 2 mL de medio completo sin antibiótico/antimicótico, por pocillo de placas estériles de 6 pocillos (Greiner). Al día siguiente se transfectó el cultivo solamente con 1,92 µg de pLJM1-Clec4F. En un tubo estéril se preparó la mezcla ADN-DMEM de forma de que contuviera la cantidad necesaria de ADN en un volumen final de 260 µL de DMEM sin aditivos. Se homogeneizó brevemente dicha mezcla. En un segundo tubo estéril, se preparó la mezcla PEI-DMEM. Para 1,92 µg de ADN, se utilizaron 16 µL de PEI 10 mM y se agregaron a 224 µL de DMEM sin aditivos; luego se homogeneizó brevemente. Se continuó el protocolo como se describió en 3.2.1.2. Tras 48 horas de cultivo, se agregó puromicina para una concentración final de 5 µM para iniciar la selección de las células que fueron transfectadas, y que por lo tanto expresaban el gen que les confería la resistencia a este antibiótico.

3.3 Experimentos *in vivo*

3.3.1 Inyección de materiales de la LL

Se inyectaron ratones hembras C57BL/6 WT o *Clec4f*^{-/-} con 100 o 200 µg de masa seca de sLL (o sus variantes) por individuo, disueltos en 100 µl de PBS, o con vehículo (PBS) solamente, en la vena lateral de la cola, empleando agujas 30G. En los experimentos de inyección de wpLL o pLL, se inyectaron 250 o 450 µg (según se especifica en cada caso) de masa seca de los materiales LL disueltos en 100 µl de PBS, vía intraperitoneal, o se

inyectó vehículo solamente. Tras 20 minutos o 22 horas, según se indica para cada experimento, se sometieron los animales a eutanasia utilizando el anestésico inhalatorio isofluorano (Isoforine®, Cristália).

Ambos tipos de procedimientos estaban aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), con los protocolos 101900-001017-16 y 101900-000994-16.

3.3.2 Modelo de infección experimental secundaria con *E. granulosus*

Se inyectaron ratones hembras Balb/c WT, C57BL/6 WT o *Clec4f^{-/-}* con 2500 PSC viables en 200 µl de PBS, o se inyectó vehículo solamente (animales control), por vía intraperitoneal, empleando agujas 23G. Los animales control fueron marcados en las orejas con sacabocado, y ambos grupos de ratones (control e infectados) fueron mantenidos co-habitando en las mismas cajas durante 7 meses, luego de los cuales se sometieron a eutanasia con isofluorano. A este tiempo la infección secundaria de ratones por *E. granulosus* es fácilmente comprobable ya que las hidátides pueden ser vistas al ojo desnudo⁸³. En el caso de la infección de ratones Balb/c, los procedimientos fueron llevados a cabo por el Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin, del mismo laboratorio. A tiempo final, se recuperaron las células de la cavidad peritoneal y de la fracción no parenquimal hepática (FNPH) para su posterior análisis por citometría de flujo, y de bazo para re-estimulación específica de antígeno *in vitro* y cuantificación de citoquinas indicativas de respuesta T en los sobrenadantes. Además, se analizaron por histología las células de la cavidad peritoneal, y los tejidos de hígado, bazo, ganglio mesentérico, pulmón, intestino delgado y riñón. Todos los procedimientos histológicos fueron realizados, sobre muestras generadas por nosotros, por el laboratorio del Dr. Thomas Barth (*Institut of Pathology*, Universidad de Ulm, Alemania). También se recuperaron, de los animales infectados, las hidátides desarrolladas en la cavidad peritoneal para determinar la carga parasitaria en base al volumen total de las hidátides, medido por desplazamiento de agua en una probeta. Aquellos ratones que no albergaban hidátides detectables al ojo desnudo en cavidad peritoneal al momento de la eutanasia no se tomaron en cuenta para el estudio. Los procedimientos realizados fueron aprobados por la CHEA con el protocolo 101900-000649-17.

3.3.3 Procesamiento de los tejidos colectados de los experimentos *in vivo*

3.3.3.1 Preparación de la fracción no parenquimal hepática (FNPH)

Inmediatamente luego de la eutanasia de los animales, se procedió a exponer la vena cava inferior para perfundir el hígado con 10 ml de PBS frío, de forma de remover la mayor parte de la sangre presente en los sinusoides hepáticos, y por lo tanto las células que por ella circulan. Luego se removió el lóbulo hepático izquierdo y se mantuvo a las muestras hasta su procesamiento en medio RPMI 1640 (Sigma, R6504) frío. A continuación, se removió el medio del tejido por secado con papel absorbente, se masó, y se procesó el tejido mecánicamente mediante cortes con hoja de afeitar sobre una placa de Petri en hielo, durante 2 minutos aproximadamente, hasta disgregarlo. Este material disgregado fue colocado en tubo de 50 ml y digerido enzimáticamente con 5 ml de la mezcla enzimática de RPMI con 0,4 U/ml de *Liberasa* (Sigma) y 80 U/ml de ADNasa I (Sigma)) cada 2,5 g de tejido, durante 25 minutos a 37°C, en agitador orbital a 250 rpm, con agitación manual adicional vigorosa cada 5 minutos. Se detuvo la digestión por pasaje de los tubos a hielo y la adición de 25 ml por tubo de medio RPMI frío. El digerido se filtró con *cell strainers* (Thermo Fischer) de 100 µm y el filtrado se centrifugó a 300 g por 5 minutos. Las células se re-suspendieron en 15 ml de RPMI y fueron nuevamente centrifugadas a 300 g. Se lisaron los glóbulos rojos por re-suspensión de las células en 1 ml de tampón de lisis (Sigma R7757) e incubación por 2 minutos. Luego se adicionaron 2 ml de tampón FC (del inglés *flow cytometry*), consistente en PBS suplementado con seroalbúmina bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) 0,5 % m/v y EDTA 2 mM). Se centrifugaron las muestras nuevamente a 300 g durante 5 minutos y se resuspendieron las células en 3 ml de tampón FC, tras lo cual se filtraron con *cell strainers* de 40 µm. Se determinaron los números celulares por conteo automático utilizando el contador *Nexcelom Cellometer K2* con tinción con naranja de acridina/ioduro de propidio (AOPI, por sus siglas en inglés), para determinar viabilidad celular.

3.3.3.2 Obtención de células de la cavidad peritoneal

Se realizaron dos lavados peritoneales sucesivos empleando en cada uno 5 ml de RPMI frío adicionado con 0,2 % v/v SFB inactivado por calor. Se juntaron los productos de los dos lavados y se determinaron los números de las células recuperadas por conteo automático como se describió previamente. Se mantuvieron las células en frío hasta su procesamiento para citometría de flujo.

3.3.3.3 Obtención y cultivo de esplenocitos

En cámara de flujo, los bazos fueron dispuestos sobre placas de petri, y disgregados con pinzas, entre dos mallas de serigrafía, y utilizando 5 ml por órgano de medio RPMI suplementado con 10 mM HEPES y antibiótico/antimicótico, de forma de obtener suspensiones celulares. A continuación, se centrifugaron las suspensiones a 350 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lisaron los glóbulos rojos durante 2 minutos por agregado de 3 ml por bazo de NH_4Cl 0,168 M en agua apirógena. Luego, las células se diluyeron rápidamente en medio de cultivo, se centrifugaron a 350 g por 5 minutos, y se volvieron a suspender en medio RPMI adicionado con antibiótico/antimicótico, 55 mM de 2-mercaptoetanol y 10 % v/v SFB (inactivado por calor), para proceder a su conteo. El número de esplenocitos en las muestras se determinó como se indicó previamente. Se sembraron 2×10^6 esplenocitos por pocillo de placa de 96 pocillos de fondo plano (Greiner) para ser re-estimuladas en forma específica de antígeno. La fuente de antígenos utilizada fue líquido hidático (LH) proveniente de hidátides bovinas fértiles. El LH fue previamente concentrado 10 veces por centrifugación en dispositivos *Centricon* (Millipore, 100 kDa de tamaño de corte), de tal forma que al ser agregado a los pocillos de re-estimulación se lograra una dilución final 1:1 (v/v) en relación al LH original. El cultivo se mantuvo durante 72 horas a 37°C y con atmósfera de CO_2 controlada al 5 % v/v. A las 72 horas se colocó la placa de cultivo en hielo y se retiraron los sobrenadantes para analizar el contenido de citoquinas por ELISA.

3.4 Técnicas de análisis

3.4.1 Determinación del radio hidrodinámico de las preparaciones de sLL por análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS)

Se determinó el radio hidrodinámico (RH) de las partículas de sLL libre de InsP6 obtenidas por DLS (del inglés, Dynamic Light Scattering) con la colaboración del MSc. Federico Carrión de la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo. Se colocaron 70 μ l de sLL a una concentración de 0,1 mg/mL en cubeta descartable UVette y se realizaron tres medidas consecutivas a 25°C en el equipo Zetasizer NanoS (MALVERN, España). Este equipo determina la dispersión de la luz dinámica; mide la difusión de partículas en movimiento browniano, y convierte estos valores a una distribución de tamaños utilizando la relación de Stokes-Einstein. Además, mediante diferentes algoritmos se obtienen datos de la distribución de tamaños de la muestra tomando en cuenta sólo la intensidad de dispersión de la luz o corrigiendo esta intensidad por el volumen (ya que las partículas grandes dispersan luz con una intensidad mucho mayor).

3.4.2 Evaluación de la oxidación los residuos monosacáridicos terminales de la LL y de la incorporación de biotina por *dot blot*.

La oxidación de los glicanos terminales de la LL por periodato se evaluó en términos de la inhibición de la unión de PNA biotilada⁴⁵, seguida de estreptavidina-peroxidasa, mientras que la incorporación de biotina en las muestras de LL se evaluó por unión de estreptavidina-peroxidasa directamente. Ambas verificaciones se realizaron por *dot blot*, para lo cual se sembraron membranas de nitrocelulosa con 3 μ l de cada muestra, correspondientes a 10, 20 o 40 μ g de masa seca de LL. Para evaluar la oxidación de los glicanos se sembraron las muestras de sLL-BH₄ y sLL-IO₄ previo a su conjugación a biotina. Se dejaron secar las muestras, y se bloquearon las membranas con PBS-BSA 1 % m/v durante una hora a temperatura ambiente, se incubaron las membranas con una dilución 1/2000 de PNA-biotina (Vector Laboratories), se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,05 % m/v y a continuación se agregó una dilución 1/2500 de

estreptavidina-peroxidasa (Thermo, Invitrogen) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 0,05 % y se reveló mediante el agregado de sustrato quimioluminiscente (*ECL Supersignal West Pico Chemiluminescent substrate*, Thermo Pierce, #34078). Los *dot blots* se visualizaron en el equipo *Universal Hood II* de BioRad. Para evaluar la incorporación de biotina a las muestras de sLL, se sembraron las mismas, así como una proteína irrelevante conjugada a biotina como control positivo, y se procedió de la misma forma que la mencionada previamente, salvo que luego del bloqueo se agregó directamente la estreptavidina-peroxidasa.

3.4.3 Evaluación de la expresión de Clec4F por *western blot*

Se prepararon lisados celulares de los cultivos de células transfectadas/transducidas para expresión de Clec4F. Para esto se quitó el medio de cultivo a las células y se les agregó a las mismas tampón de lisis (Tritón X-100 1 % m/v en PBS adicionado con inhibidor de proteasas-Santa Cruz Biotechnology), se centrifugó a 10000 g para remover el ADN, y se almacenaron las muestras a -20°C hasta su análisis.

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, del *inglés sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) de acuerdo a lo descrito en¹⁶⁶ (Laemmli 2970). Se emplearon geles concentradores al 3 % m/v y geles separadores al 10 % m/v, todos de 1,5 mm de espesor. Las electroforesis se realizaron en el sistema *Mini Protean 3* de Bio-Rad, a una corriente constante de 30 mA por gel y temperatura ambiente. A las muestras disueltas en solución amortiguadora de muestra 2X (Tris/HCl 0,2 M, pH 8, urea 8 M, SDS al 0,2 % m/v, conteniendo azul de bromofenol) se les agregó el agente reductor ditioneitol (DTT) a concentración final de 40 mM, y se calentaron a 100°C durante 5 minutos.

A continuación, se transfirieron las muestras corridas en SDS-PAGE a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Para esto, en primer lugar, se incubaron membranas de PVDF con metanol durante 5 minutos para su activación. Luego los geles de poliacrilamida y las membranas de PVDF se equilibraron con solución de transferencia (Tris base 48 mM, glicina 39 mM y metanol al 20 % v/v) y se dispusieron en el *cassette*

de transferencia entre papeles de filtro embebidos en la misma solución (en el orden: ánodo/papeles de filtro/gel/membrana/papeles de filtro/cátodo) utilizando el equipo *Mini-PROTEAN Tetra Cell and Blot Module* de Bio-Rad. Las transferencias se realizaron a razón de 56 V durante toda la noche a 4°C. Una vez finalizado el proceso, se incubaron las membranas en solución de bloqueo (PBS conteniendo Tween-20 al 0,1 % m/v y 5 % m/m de leche en polvo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas obtenidas según lo descrito anteriormente se lavaron con 50 mL de solución de lavado (PBS conteniendo Tween-20 al 0,05 % m/v) durante 5 minutos con agitación, y a continuación se incubaron con 2 mL de una dilución 0,5 µg/mL del anticuerpo anti-Clec4F en solución de bloqueo toda la noche a 4°C o durante 2 horas a temperatura ambiente, siempre con agitación. A continuación se lavaron las membranas 2 veces con solución de lavado y se las incubó durante 1 hora y media a temperatura ambiente con 2 mL de una dilución 0,2 µg/mL del anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a peroxidasa (sc2768), diluido en solución de bloqueo. Luego se realizaron 4 lavados en condiciones iguales a los anteriores y se reveló como se describió en la sección anterior.

3.4.4 Citometría de Flujo para análisis de la FNPH y de las células de la cavidad peritoneal, o de cultivos de líneas celulares modificados para expresión de Clec4F o GFP.

Para las muestras obtenidas de los experimentos *in vivo*, se sembraron $0,35 \times 10^6$ células vivas de lavados peritoneales o $0,5 \times 10^6$ de la FNPH en placas con pocillos en fondo en V (Greiner), se lavó con 100 µl de PBS por pocillo y se centrifugó a 350 g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con una sonda de viabilidad (LIVE/DEAD™ cell stain kit, Invitrogen). Esta sonda se une covalentemente a poliaminas de la superficie celular (cuando la membrana celular está íntegra) y fluoresce con baja intensidad. Sin embargo, si hay compromiso de la membrana celular, la sonda ingresa al citosol, se une a las poliaminas intracelulares, y fluoresce con mayor intensidad. De esta forma, las células con mayor intensidad de fluorescencia se consideran muertas. Luego se bloquearon los receptores Fc celulares por incubación durante 20 minutos con 15 µl por pocillo de tampón FC adicionado con 16,7 % v/v de suero normal de rata (Unidad de Reactivos y

Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina) y 25 ng de anti-CD16/CD32 (BioLegend). Se realizó la tinción de marcadores de superficie empleando los anticuerpos indicados en la Tabla 3.3, durante 30 minutos a 4°C. Se realizaron 2 lavados con 100 µl de tampón FC por pocillo y se fijaron las células por incubación con 100 µl por pocillo de una solución de paraformaldehído (PFA) (Sigma) al 1 % m/v en PBS, durante 20 minutos a 4°C. Se realizaron 2 lavados con FC nuevamente, y se permeabilizaron las células para realizar tinción intracelular, por incubación con tampón de permeabilización (eBioscience, Thermo Fischer), O/N a 4°C. La tinción intracelular, que se hizo en tampón de permeabilización, implicó dos pasos. El primer paso fue el agregado de 50 µl por pocillo de una dilución las sondas para la detección de material de la LL eventualmente internalizado (PNA o el anticuerpo monoclonal de ratón E492, ambos biotinilados) o para la detección de un marcador de polarización M(IL-4) de macrófagos (Relm- α), anticuerpo específico biotinilado, Peprotech). El segundo paso, realizado luego de dos lavados con tampón de permeabilización, consistió en agregar 50 µl de una dilución de estreptavidina conjugada a un fluoróforo (como se describe en el punto "Sondas empleadas para detección de materiales de la LL"). Finalmente, luego de los dos lavados con tampón de permeabilización, se resuspendieron las células en 75 µl por pocillo de tampón FC. El nivel de expresión de moléculas de interés, así como el nivel de internalización de materiales de la LL, fue estimado en términos del promedio geométrico de intensidad de fluorescencia (MFI, del inglés *mean fluorescence intensity*), así como en porcentaje de células positivas. Los umbrales de fluorescencia para separar células negativas y positivas fueron establecidos empleando controles del tipo "fluorescencia menos uno" (FMO, del inglés, *Fluorescence Minus One*), a excepción de los experimentos mostrados en las Figuras 4.9 y 4.11. de la sección Resultados, en los cuales el umbral de fluorescencia se fijó según los datos del grupo control de vehículo (PBS).

Para evaluar la expresión de Clec4F o de GFP luego de la transducción o transfección de los cultivos celulares, se procedió en forma similar a lo antes descrito. Se despegaron las células de las placas de cultivo por agregado de solución de PBS con EDTA 3 mM y glucosa al 0,1 % m/v durante 10 minutos a 37°C, se despegaron las células por pipeteo, y se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en V para su tinción, que se hizo a

4°C durante todos los pasos. En estas células solamente se realizó tinción de superficie de Clec4F o se analizó directamente la expresión de GFP en base a la fluorescencia intrínseca de esta proteína.

Los datos fueron adquiridos en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) (o en algún caso puntual, en el BD Excalibur también de BD Biosciences), en el Instituto de Higiene, y analizadas empleando el software Flowjo versión 7.6.

Anticuerpo/sonda	Dilución final/ concentración	Clon	Proveedor/ Código	Reactivo secundario	Utilizado antes o después de permeabilización
Sonda de viabilidad LIVE/DEAD™ <i>Fixable far red dead cell stain kit</i>	1/500	-	Thermo (Invitrogen)/L10120	-	antes
Sonda de viabilidad LIVE/DEAD™ <i>Fixable Green dead cell stain kit</i>	1/500	-	Thermo (Invitrogen)/L34970	-	antes
Anti-CD45 APC-Cy7	1/200	30-F11	Biolegend/103116	-	antes
Anti-F4/80 PE-Cy7	1/300	BM8	Biolegend/123114	-	antes
Anti-CD11b PerCP-Cy5	1/400	M1/70	Biolegend/ 45-0112-82	-	antes
Anti-CD31 BV421	1/200	390	Biolegend/102424	-	antes
Anti-Clec4F	1/50	Policlonal de cabra	R&D/AF 2784	Anti-IgG de cabra hecho en burro Alexa Fluor 488	antes y después
Anti-IgG de cabra Alexa Fluor 488	1/700	Policlonal de burro	Thermo (Invitrogen)/A11055	-	antes y después
Anti-CD16/CD32	1/2000	2.4G2	Biolegend/553142	-	antes
Anti-CD19 APC-Cy7	1/200	6D5	Biolegend/115530	-	antes
Anti-TCRβ APC-Cy7	1/200	H57-597	Biolegend/109220	-	antes
Anti- MHC-II PerCP	1/400	M5/114.15.2	Biolegend/67624	-	antes
Anti-Ly6C BV421	1/200	HK1.4	Biolegend/128032	-	antes
Anti-PD-L1 APC	1/200	10F.9G2	Biolegend/124312	-	antes
Anti-Relm-α- biotina	1/100	Policlonal de conejo	PeptoTech/ 500-P214Bt	Estreptavidina-PE	después
Estreptavidina-PE	1/200	-	eBioscience/405204	-	después

Tabla 3.3. Anticuerpos y sondas de viabilidad utilizados en citometría de flujo. Se detallan los anticuerpos y sondas fluorescentes utilizadas en citometría de flujo. APC= alofocianina; Cy7= cianina 7; FITC= isotiocianato de fluoresceína; PE= ficoeritrina; PerCP= *Perinidin Chlorophyll Protein*, L/D= *live/dead*.

3.4.5 Cuantificación de citoquinas en solución mediante ELISA

Para determinar la concentración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo se utilizó la técnica de ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) en su modalidad de captura. Se emplearon *kits* comerciales para cuantificar las citoquinas (ver

Tabla 3.4), excepto para interferón- γ (IFN- γ), para la cual se usó un ELISA con pares de anticuerpos (el de captura producido en el laboratorio de JE Allen, Reino Unido, y el de detección biotinilado, un anticuerpo comercial; ver Tabla 3.5). Los pasos generales seguidos empleando *kits* para medir las diferentes citoquinas se enumeran a continuación. Primero se sensibilizaron placas de ELISA Greiner de alto nivel de unión con 50 μ l/pocillo de anticuerpo de captura diluido en el tampón indicado por el fabricante en cada caso, durante toda la noche a 4°C. Segundo, se bloquearon los pocillos con 100 μ l por pocillo de una solución de PBS conteniendo 10 % (v/v) SFB, o 1 % (m/v) BSA (según indicaciones de fabricante) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tercero, se incubaron los pocillos con 50 μ l por pocillo de las muestras (a la dilución correspondiente) o con diluciones seriadas de la solución estándar correspondiente, durante 2 horas a temperatura ambiente u O/N a 4°C (según indicaciones del fabricante). Cuarto, se incubaron los pocillos con 50 μ l de un anticuerpo de detección biotinilado, durante 2 horas a temperatura ambiente. Quinto, se incubaron los pocillos con 50 μ l de estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa. Luego de cada incubación, la placa se lavó con una solución de PBS conteniendo 0.05 % (m/v) Tween-20. El desarrollo de color se logró luego del agregado de 100 μ L de una solución de tetrametilbencidina (TMB) y H₂O₂ 0.01 % (v/v) en tampón citrato-fosfato 0.5 M, pH 5. La reacción colorimétrica se detuvo por el agregado de 50 μ l por pocillo de una solución de H₂SO₄ 0.3 M y se midió la absorbancia a 450 nm.

Citoquina	Proveedor	N° de catálogo
IL-5	BD	555263
IL-10	BD	555252
IL-13	R&D	DY413
IL-17	R&D	DY421
TGF- β	R&D	DY1679

Tabla 3.4. Kits de ELISA comerciales empleados para la cuantificación de citoquinas. Se detalla el proveedor y el número de catálogo de los kits comerciales de ELISA empleados para la determinación de la concentración de citoquinas de los distintos perfiles T.

Captura	L	Bloqueo	L	Detección I	L	Detección II	L	Revelado
50 µl anti-IFN-γ (R46A2) 2 µg/ml en Na ₂ CO ₃ 0,1M NaHCO ₃ 0,1 M pH 9,6 O/N 4°C	3	100 µl PBS-10% SFB, 1 hora a temperatura ambiente	5	50 µl anti-IFN-γ-biotina (XMG.2) 1/2500 1 hora a 37°C	5	50 µl estreptavidina-HRP 1/1000 30 min a 37°C	8	100 µl TMB, 0,01% H ₂ O ₂

Tabla 3.5. ELISA para la cuantificación de IFN-γ. Se detallan los reactivos empleados en cada uno de los pasos del ELISA de captura, puesto a punto en el laboratorio de la Dra. JE Allen (Universidad de Manchester, Reino Unido), para la cuantificación de IFN-γ. (L: número de lavados realizados con PBS-Tween 20 0,05% m/v).

3.4.6 Estudio de la especificidad de Clec4F por motivos glucídicos de la LL de *E. granulosus* mediante ELISA de competencia

Se evaluó la especificidad de Clec4F por motivos glucídicos de la LL nativa, a través de un ELISA de competencia, en el cual se sometieron a competir, por la unión a las mucinas de la LL, a PNA o E492 (ambas de especificidades conocidas) con Clec4F recombinante. Para esto se sensibilizaron placas de ELISA con 100 µL de 10 µg/mL (masa seca) de sLL en tampón tris salino (TBS) O/N a 4°C. Posteriormente se bloquearon los pocillos con 200 µL de TBS conteniendo 0,05 % (m/v) de Tween 20, 1 % (m/v) de BSA y 0,5 % (v/v) de solución de bloqueo *Carbo-Free* (Vector Laboratories). Para la competencia se ensayó luego una concentración fija de Clec4F recombinante (80 ng/mL) con concentraciones variables de PNA o E492 (0,0045-450 µg/mL) como agentes competidores, en un volumen final de 100 µL. Se determinó Clec4F unido a sLL unido a la placa por adición de 100 µL de anticuerpo anti-IgG humana hecho en cabra acoplado a peroxidasa a 1 µg/mL (Abcam ab97225). Luego de cada incubación, la placa se lavó con una solución de TBS conteniendo 0.05 % (m/v) Tween-20. Se procedió al revelado de la placa de ELISA como se describió en la sección anterior.

3.4.7 Procesamiento de tejidos para análisis por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

De los experimentos de inyección de pLL o de infección experimental, tras la eutanasia de los animales, se tomaron muestras de tejido (de aproximadamente 0,5 mm³) de

hígado, bazo, ganglio mesentérico, riñón, pulmón e intestino delgado, así como células de la cavidad peritoneal, y se colocaron en formalina neutra tamponada al 10 % (solución acuosa de formaldehído) hasta su procesamiento. Las muestras de hígado correspondían a animales sometidos a perfusión con PBS, ya que estas muestras también fueron analizadas por citometría de flujo. Estas muestras se enviaron al laboratorio del Dr. Thomas Barth (Universidad de Ulm, Alemania), donde se realizaron los estudios por inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia. Para esto se generaron bloques de parafina de todos los tejidos a analizar y se realizaron cortes histológicos de 2 μm , que se montaron en vidrios portaobjeto. Tras pasos de rehidratación de los tejidos montados, se realizó la tinción para detección de los materiales de la LL solamente (inmunohistoquímica) o para detección de los materiales de la LL junto con la tinción de F4/80 o Clec4F como marcadores fenotípicos de KC, como se detalla en la Tabla 6. Se realizaron controles de tinción en los cuales se omitió el paso del anticuerpo primario. La contratinción se realizó con hematoxilina en el caso de la inmunohistoquímica o con DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) para la inmunofluorescencia. Los cortes fueron analizados en el microscopio AxioPhot (Oberkochen, Alemania).

Técnica	Sonda	Dilución final/ concentración	Clon	Proveedor	Reactivo secundario
Inmunohistoquímica	PNA-biotina	10 ug/ml	-	Vector Laboratories	Complejo avidina-biotina (Kit EnVision)
	E492-biotina	3 ug/ml	E492 (IgG3 monoclonal de ratón)	Producido en el laboratorio	Complejo avidina-biotina (Kit EnVision)
	Complejo avidina-biotina (Kit EnVision)	-	-	Dako	-
Inmunofluorescencia	E492-biotina	3 ug/ml	E492 (IgG3 monoclonal de ratón)	Producido en el laboratorio	Estreptavidina-Alexa Fluor 488
	Anti-Clec4F	1/50	370901	Thermo Scientific	Anti-IgG rata policlonal de cabra-biotina, Estreptavidina-Alexa Fluor 546
	Anti-F4/80	1/100	BM8	Invitrogen	Anti-IgG rata policlonal de cabra-biotina, Estreptavidina-Alexa Fluor 546

Ver leyenda de Tabala 3.6 en la siguiente página.

Tabla 3.6. Anticuerpos y sondas empleadas para la detección de materiales de la LL y su colocalización con las KC, por microscopía. Se detallan los anticuerpos y sondas fluorescentes utilizadas en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para la detección de materiales de la LL y su colocalización con las KC.

3.5 Procesamiento de datos

3.5.1 Cuantificación de la carga parasitaria

Tras la eutanasia de los animales, se recuperaron las hidátides presentes en cada uno de los individuos infectados. Se estimó la carga parasitaria por medida de desplazamiento de volumen de agua. Para esto se colocaron 20 ml de agua en una probeta de 100 ml, seguidos por las hidátides de cada animal infectado (previamente escurridas en colador), y se estimó el volumen correspondiente a la carga parasitaria en base al volumen de agua desplazado. En los animales con muy poca carga parasitaria (menor a 1 ml), se realizó la estimación en tubo graduado de 1,5 ml.

3.5.2 Estimación de la contribución de los tipos celulares de la FNPH a la captación de materiales de la LL

Se estimó la contribución de cada uno los diferentes tipos celulares de la FNPH estudiados a la captación de los materiales de la LL. A continuación se muestra el cálculo empleado, usando como ejemplo la estimación de la contribución de las KC.

$$\begin{array}{l} \text{Contribución de las} \\ \text{KC a la captación de} \\ \text{materiales de la LL} \\ \text{dentro de las} \\ \text{células de la FNPH} \end{array} = \frac{(\text{Frec. KC LL}^+ \times \text{IFP}_{\text{KC LL}^+}) \times 100}{\sum(\text{Frec. Célula LL}^+ \times \text{IFP}_{\text{Célula}})}$$

Notas:

- *KC LL⁺ son las KC detectadas como positivas para materiales de LL*
- *Célula LL⁺ son las células de cualquiera de los tipos celulares de interés detectadas como positivas para materiales de LL*

- *Frec.:* es la frecuencia de células vivas de cada tipo celular de interés de la FNPH (KC, LSEC o células CD11b⁺ no KC) que captaron materiales de la LL dentro del total de células vivas.
- *IFP:* es el promedio aritmético de la intensidad de fluorescencia para la señal de LL para las células positivas para dicha señal dentro de cada tipo celular de la FNPH.

Los datos así obtenidos se representaron en formato de gráficos de barras apiladas.

3.6 Análisis estadístico

Debido a que los datos obtenidos no cumplían con los requisitos necesarios para aplicar ensayos estadísticos paramétricos, en la presente Tesis se emplearon métodos estadísticos no paramétricos, basados en rangos. Cuando el número de ratones por grupo era el mismo en todas las condiciones experimentales ensayadas y en las repeticiones de los experimentos, se empleó el test exacto de Mack-Skillings para comparaciones de dos vías. Cuando los datos no cumplían con la condición anterior, se juntaron los datos de las repeticiones de los experimentos y se aplicó el test modificado de Wilcoxon-Mann-Whitney (para comparar solamente dos condiciones experimentales)¹⁶⁷, o el test Kruskal-Wallis (para comparaciones entre más de dos condiciones experimentales)¹⁶⁸. Cuando el test de Mack-Skillings o el de Kruskal-Wallis arrojaron valores de P menores a 0,05, se aplicó el test para comparaciones múltiples descrito por Conover¹⁶⁹ y la corrección por Benjamini-Hochberg para controlar la tasa de falsos positivos¹⁷⁰. Para el estudio de correlaciones entre dos variables se aplicó el test no paramétrico Tau de Kendall. A lo largo de la sección “Resultados”, los símbolos *, ** y *** representan P valores menores que 0,05, 0,01 y 0,001, respectivamente.

4 Resultados

Esta sección está dividida en tres capítulos. El primer capítulo abarca la descripción de las actividades realizadas en pos de generar una línea de macrófagos de ratón modificados para la expresión de Clec4F. Con esto se buscaba generar una herramienta de fácil manejo que permitiera profundizar en la caracterización funcional del receptor a través de ensayos *in vitro*. El segundo y tercer capítulo, si bien abarcan distintos objetivos, están íntimamente relacionados y comprenden la mayor parte de los resultados obtenidos durante la presente Tesis. En el segundo capítulo se detallan los resultados del estudio de la captación en hígado de materiales de la LL exógenos, solubles o particulados, en ratones WT o *Clec4f^{-/-}*. Finalmente, en el tercer capítulo se describen los resultados obtenidos en el modelo de infección experimental secundaria intraperitoneal con *E. granulosus sensu stricto* en ratones WT o *Clec4f^{-/-}*. Este capítulo a su vez se divide en dos partes. En la primera se detallan los resultados obtenidos con respecto a la biodistribución de los materiales de la LL en el organismo del animal en el contexto de la infección. En la segunda se describen los resultados preliminares obtenidos sobre los posibles efectos de la interacción de la LL con Clec4F sobre aspectos de la respuesta inmune local, sistémica y hepática.

4.1 Capítulo 1:

Generación de líneas de macrófagos de ratón que expresan Clec4F.

Al momento del inicio de la presente Tesis existía muy poca bibliografía en cuanto a la purificación y cultivo de KC primarias de ratón. Al inicio de este trabajo se realizaron ensayos para la purificación de KC desde la FNPH de ratón por adherencia al plástico, en forma similar a lo que se describe en Li *et al.* 2014¹¹⁴. Se plaqueó la FNPH y luego de 2 horas de cultivo se realizaron lavados del mismo por centrifugación para eliminar a las células no adheridas al plástico. Luego se despegaron las células que efectivamente se encontraban adheridas a la placa de cultivo. El análisis por citometría de flujo de dichas células mostró que la purificación no resultó exitosa, ya que se encontraron las mismas células y en la misma proporción que las presentes originalmente en la FNPH (datos no mostrados). A esto se le suma que Yang *et al.* 2013¹²⁷ reportaron que, si bien lograban

purificar KC mediante centrifugación en gradiente de *percoll* y adherencia al plástico, las células perdían la expresión de Clec4F durante el cultivo, llegando a casi no detectarse la proteína tras tres días de cultivo. Estos antecedentes condujeron a la búsqueda de otra herramienta para realizar ensayos *in vitro* para la caracterización funcional de Clec4F.

Por lo antes expuesto, se buscó generar una línea de macrófagos con expresión estable de Clec4F. Según un antecedente publicado¹¹⁹, en fibroblastos transfectados para expresión de Clec4F de ratón se observó unión de ligandos a nivel de superficie celular pero no internalización. Se deseaba entonces expresar el receptor en un modelo de macrófagos, con la expectativa de que esto permitiera analizar la posible fagocitosis mediada por el mismo. Por otro lado, un modelo de macrófagos permitiría evaluar eventuales cambios fenotípicos a nivel de moléculas inmunológicamente relevantes (MHC, moléculas de co-estimulación y de co-inhibición, citioquinas) asociados a la unión y/o internalización de materiales de la LL por estas células.

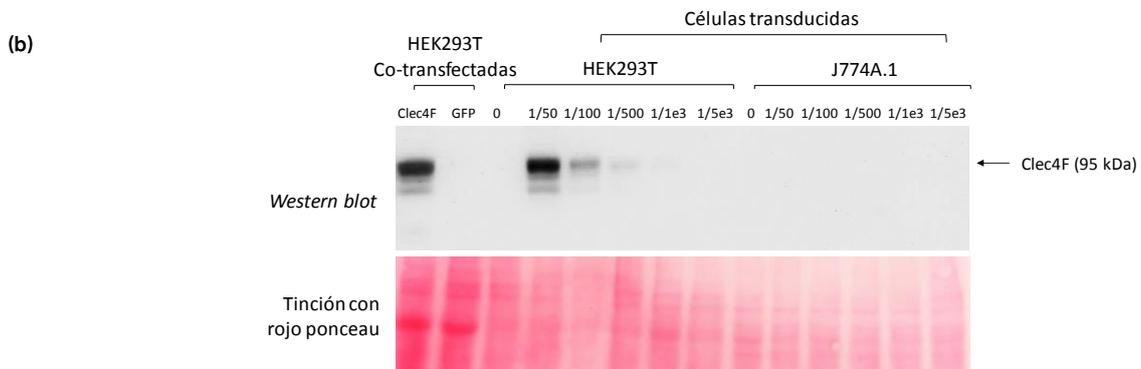
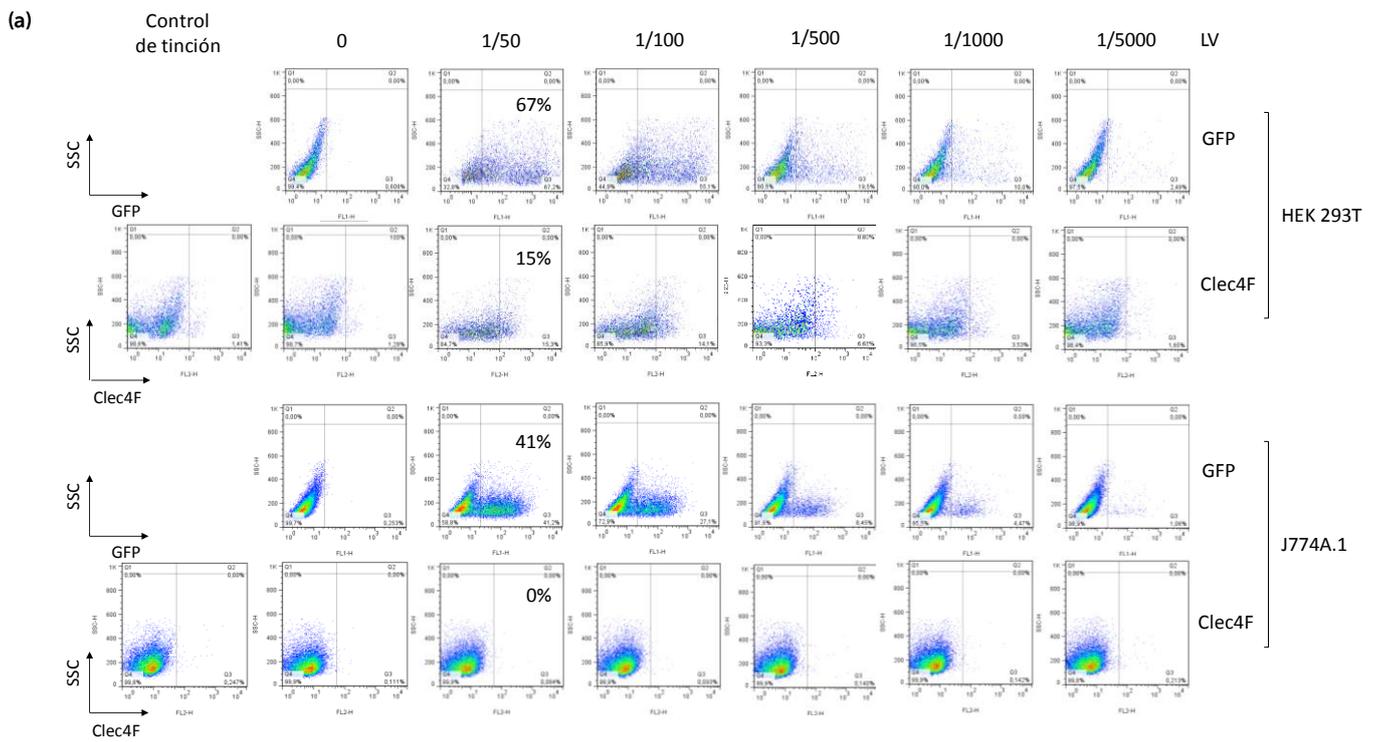
Dada la conocida dificultad de transfectar macrófagos¹⁶⁰, se optó por una estrategia de transducción lentiviral, para la cual se contaba con la colaboración del MSc Diego Pérez, del grupo del Dr. Gualberto González (Laboratorio de Inmunología, Facultad de Química). Los vectores lentivirales son capaces de transmitir la información desde su genoma hacia la célula blanco, en lo que se denomina *delivery* de genes. Estos vectores son ampliamente utilizados para generar líneas celulares que expresen un transgen determinado de forma estable^{161,162}. Generalmente, la producción de vectores lentivirales (LVs) conlleva una primera etapa de transfección con diferentes plásmidos de las células productoras de las partículas de LV; en la presente Tesis se utilizó la línea celular humana HEK 293T. Posteriormente, los LVs se ensamblan y brotan de la célula productora, acumulándose en el sobrenadante celular, a partir del cual son purificados/concentrados. Estas partículas son capaces de transducir células blanco, en las cuales el transgen codificado es expresado.

Como se mencionó en la sección Materiales y Métodos, en la presente Tesis se emplearon dos variantes de la estrategia de transducción lentiviral en pos de generar

una línea de macrófagos de ratón con expresión estable de Clec4F. Ambas variantes implicaron la producción de LV pseudotipados por VSV-G, los cuales pueden transducir las líneas celulares mencionadas a continuación. En la primera variante, para la transfección se utilizó un plásmido de transferencia que carecía de marcador de selección, y se transdujo la línea de macrófagos de ratón J774A.1; en esta variante se transdujo en paralelo con LV para expresión de proteína fluorescente verde (GFP), como control de la transducción. En la segunda variante empleada, se utilizó un plásmido de transferencia que contenía un marcador de selección (resistencia a puromicina), además del gen de Clec4F. Con esta preparación de LV se transdujo la línea de macrófagos RAW 264.7. En este caso no se contaba con una preparación de LV para expresión de GFP.

A continuación, se muestran los resultados principales de los intentos realizados de generar una línea de macrófagos con expresión estable de Clec4F. Se analizó mediante citometría de flujo y *western blot* la expresión de Clec4F en los macrófagos transducidos, y como punto de comparación, en células de la línea HEK 293T (altamente susceptible a transducción lentiviral) transducidas en paralelo.

En la Figura 4.1a se muestran los resultados obtenidos empleando la primera estrategia de transducción, es decir sin marcador de selección. Para testear ambas preparaciones de LV (para expresión de GFP o de Clec4F), se ensayaron diluciones seriadas de las mismas para transducir células HEK 293T y J774A.1. Los máximos niveles de expresión de GFP alcanzados en las células HEK 293T y en J774A.1 fueron de 67 % y 41 %, respectivamente, lo que refleja la menor eficiencia de transducción en los macrófagos. Para Clec4F, el máximo nivel de expresión en células HEK 293T fue solamente del 15 %, mientras que no se detectó expresión en los macrófagos J774A.1, lo cual fue confirmado mediante *western blot* (Figura 4.1b).

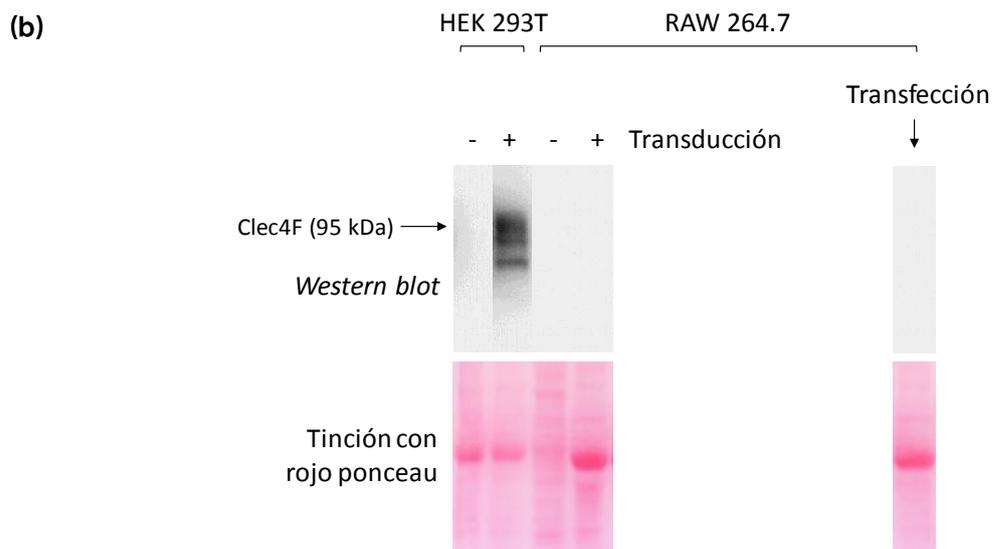
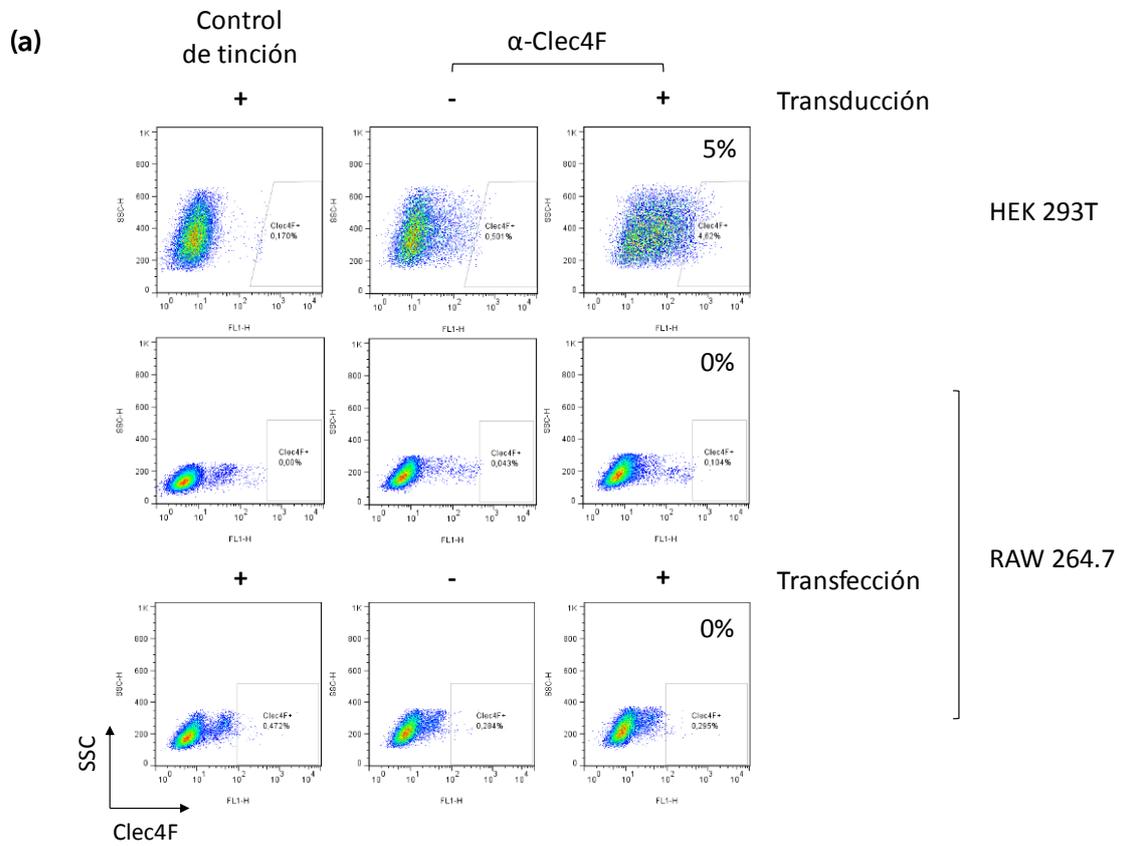


Ver leyenda de Figura 4.1 en la siguiente página.

Figura 4.1. Ensayos para la generación de cultivos de macrófagos con expresión de Clec4F empleando la estrategia de transducción lentiviral sin selección por antibiótico. Se transfectaron cultivos de HEK 293T para la producción de partículas de LV para expresión de GFP o de Clec4F como se describe en la sección Materiales y Métodos. Luego de 48 horas se recuperaron los sobrenadantes de cultivo que contenían LV, se filtraron los mismos por 0,45 μm para eliminar detritos celulares y se concentraron por centrifugación en colchón de sacarosa a 12000 g a 4°C durante 4 horas. Los precipitados obtenidos (LV) se resuspendieron cuidadosamente en PBS y se almacenaron a -80°C. Se transdujeron cultivos de HEK 293T y de J774A.1 con las diluciones seriadas indicadas (1/50 a 1/5000) de estas preparaciones de LV para expresión de GFP o Clec4F. Además, se incluyeron células sin transducir como control. (a) A las 72 de cultivo se determinaron por citometría de flujo los porcentajes de células positivas para GFP o para Clec4F presente en la superficie celular. La tinción de Clec4F se realizó en dos pasos: anticuerpo policlonal anti-Clec4F de ratón hecho en cabra seguido de un anticuerpo secundario contra IgG de cabra marcado fluorescentemente con Cy3. El umbral de la señal se determinó empleando un control de tinción consistente en incubar las células solamente con el anticuerpo secundario conjugado. (b) Se evaluó la expresión de Clec4F por *Western blot*. Se muestran de izquierda a derecha lisados de células HEK 293T transfectadas productoras de LVs para expresión de Clec4F, de células HEK 293T no transducidas, células HEK 293T transducidas, células J774A.1 no transducidas y células J774A.1 transducidas. Se reveló la presencia de Clec4F utilizando el mismo anticuerpo empleado para el análisis por citometría de flujo, y un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Se observa expresión de Clec4F en células HEK 293T co-transfectadas para producción de LV y en HEK 293T transducidas pero no en células J774A.1 transducidas.

La segunda variante de la estrategia de transducción lentiviral, con resistencia a puromicina como marcador de selección, se empleó para transducir la línea de macrófagos de ratón RAW 264.7, así como a las células HEK 293T. Previo a los ensayos de transducción con esta nueva construcción, se determinaron las concentraciones de puromicina a las cuales los cultivos de HEK 293T y RAW 264.7, que no portaban gen de resistencia a antibiótico, no crecían; estas concentraciones fueron 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. En este caso no se concentraron las partículas de LV generadas, sino que se utilizaron directamente los sobrenadantes de cultivo de las células HEK 293T productoras de LV (que contenían a las partículas de LV), para transducir los cultivos de RAW 264.7, así como de HEK 293T. Como se muestra en la Figura 4.2, nuevamente se observó expresión de Clec4F solamente en el cultivo de HEK 293T, y esto en una proporción muy baja de las células (5 %). Se realizó un intento de transfección directa de RAW 264.7 en pos de obtener un cultivo con expresión transitoria de Clec4F, pero el mismo tampoco resultó exitoso (Figura 4.2a). Se confirmó por *western blot* la ausencia

de expresión de Clec4F en los cultivos de RAW 264.7, tanto transducidos como transfectados (Figura 4.2b).



Ver leyenda de Figura 4.2 en la siguiente página.

Figura 4.2. Ensayos para la generación de cultivos de macrófagos con expresión de Clec4F empleando la estrategia de transducción lentiviral con selección por antibiótico. Se transfectaron cultivos de HEK 293T con un vector que confería resistencia a puomicina para producir partículas de LV para expresión de Clec4F, como se describe en la sección Materiales y Métodos. Luego de 48 horas se recuperaron los sobrenadantes de los cultivos que contenían LV, y se centrifugaron los mismos a 300 g durante 10 minutos para eliminar detritos celulares. Los sobrenadantes con LV se incubaron con los cultivos de HEK 293T y de RAW 264.7. Para no incubar las células a transducir con un medio completamente empobrecido en nutrientes y acidificado, la transducción se hizo en dos etapas, en cada una de las cuales se mezcló un volumen correspondiente a 2/3 del volumen del sobrenadante con 1/3 de volumen de medio completo fresco, en incubaciones de 2 horas cada una hasta utilizar todo el volumen del sobrenadante conteniendo LV. Finalizada la última incubación se dejaron transcurrir 72 horas y se seleccionaron las células transducidas por el agregado de puomicina a los cultivos de HEK 293T y de RAW 264.7 (2 y 5 µg/ml, respectivamente) durante 72 horas. En paralelo se realizó un intento de transfección directa de un cultivo de RAW 264.7. (a) Se evaluó la expresión de Clec4F por citometría de flujo como se describió en la Figura 4.1. Se muestran los resultados obtenidos de la transducción de cultivos de HEK 293T y RAW 264.7, así como de RAW 264.7 transfectadas. El umbral de la señal se determinó empleando un control de tinción como se explica en la Figura 4.1. Para evaluar el nivel de HEK 293T transducidas se empleó la condición de células no transducidas pero teñidas con anti-Clec4F y un anticuerpo secundario para determinar el umbral de la señal, ya que la señal de esta condición experimental control era mayor que la del control de tinción. Se evaluó la expresión de Clec4F por *western blot* empleando el mismo anticuerpo mencionado previamente. Se muestran de izquierda a derecha lisados de células HEK 293T no transducidas, células HEK 293T transducidas, células RAW 264.7 no transducidas, células RAW 264.7 transducidas y células RAW 264.7 transfectadas. Se reveló la presencia de Clec4F como se describió en la Figura 4.1. Se observa expresión de Clec4F en células HEK 293T transducidas pero no en células RAW 264.7 transducidas ni transfectadas.

En suma, no se pudo expresar Clec4F en líneas celulares de macrófagos, a pesar de que sí se pudo expresar GFP en cultivos de J774A.1. Si bien se logró expresión de Clec4F en cultivos de HEK 293T, la misma ocurrió en una proporción muy baja de las células, lo que dificultaba el utilizar dichos cultivos aún para ensayos de unión en superficie. Estos resultados negativos se podrían explicar en base a que la expresión forzada de Clec4F fuera “costosa” para las células y/o fuera dificultada por la ausencia de proteínas accesorias presentes en KC pero no otros tipos celulares de ratón. Estas especulaciones se basan en la observación de que, luego de la transfección con un marcador de resistencia, parece existir un silenciamiento de la expresión de Clec4F sin silenciamiento del transgen de resistencia. A lo anterior se sumaría como dificultad el hecho conocido que los macrófagos son un tipo celular difícil de transfectar/transducir¹⁷¹.

4.2 Capítulo 2:

Estudio de la captación de materiales de la LL exógenos por el hígado.

4.2.1 Consideraciones generales y herramientas utilizadas

En infecciones en humanos por *E. granulosus*, se ha reportado la presencia de partículas de la LL tanto en el sitio donde se aloja el parásito como en ganglios drenantes⁹¹. Si bien no se ha estudiado la liberación de componentes solubles de la LL durante la equinococosis quística, es posible que parte de los materiales sean liberados de la LL en ese estado. Estos antecedentes, sumados a los datos previos del grupo en los que se reportó la interacción de Clec4F con glicanos de la LL, llevaron a estudiar si en el modelo de ratón las KCs podrían captar *in vivo* a través de este receptor materiales de LL tanto en formato soluble como particulado. Para este estudio, se empleó como herramienta la citometría de flujo, aplicada a la FNPH, y como se comenta más adelante, para el caso de la inyección de materiales particulados, se complementó el análisis con estudios por inmunohistoquímica.

En la Figura 4.3 se muestra la estrategia de clasificación por citometría de flujo de las células presentes en la FNPH. Con esta estrategia, que es empleada a lo largo de toda la Tesis, se discriminan KCs, LSECs y las células CD11b⁺ no KC. Además de estudiar a las KCs, fue de interés analizar a las LSECs y a las células CD11b⁺ no KC ya que las primeras, a pesar de no ser células inmunes, poseen una gran batería de receptores fagocíticos y se encuentran expuestas a la luz vascular y en íntimo contacto con las KC, y las segundas porque, si bien se trata de una amplia definición, incluyen a otros fagocitos (monocitos, otros macrófagos y neutrófilos) presentes en el hígado, además de las KCs.

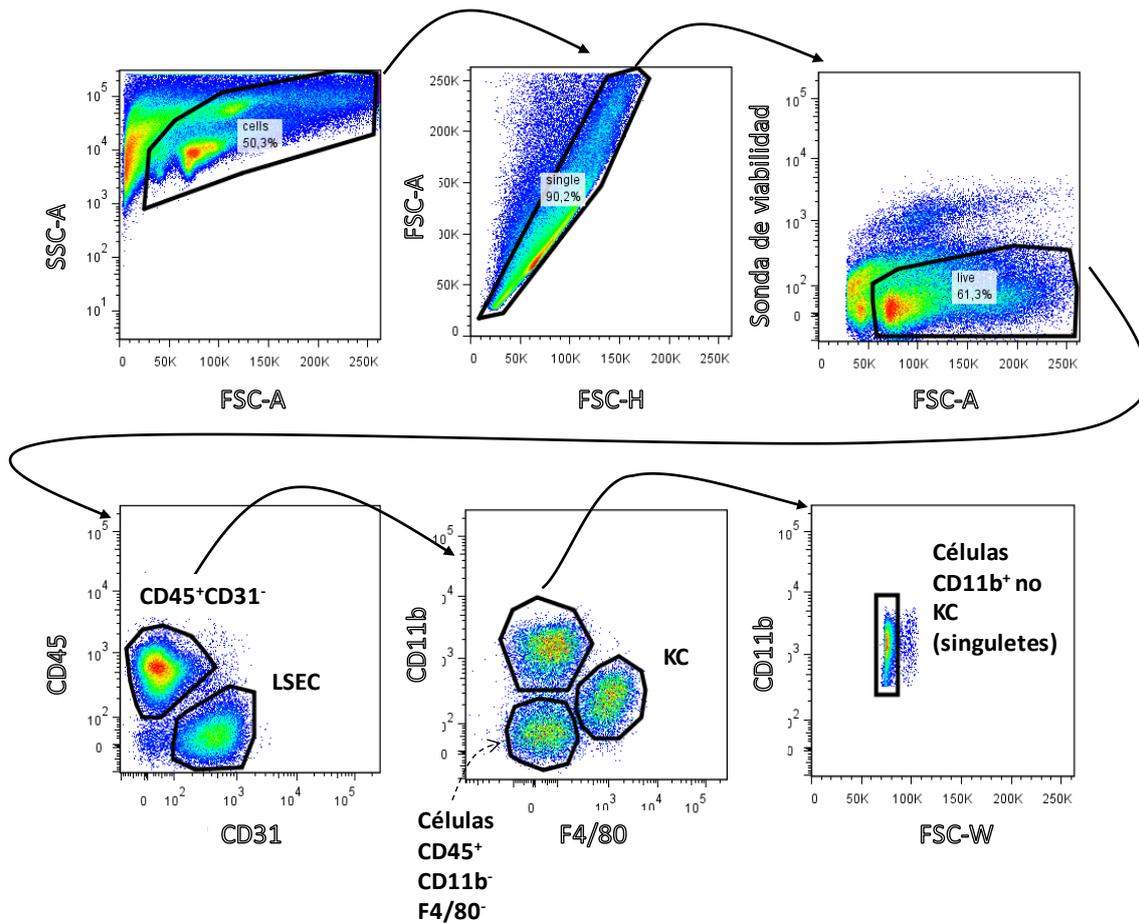


Figura 4.3. Estrategia de definición celular para células de la FNP. Se muestra la estrategia de definición celular empleada para discriminar KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC en la FNP. Para las células CD11b⁺ no KC, que tienden a ser bastante más pequeñas que las KC, fue necesario incluir un paso más de exclusión de dobletes al final de la estrategia de clasificación. Las KC se definieron como células CD45⁺CD31⁻F4/80^{hi}CD11b^{int}, las LSEC como CD45⁻CD31⁺ y las CD11b⁺ no KC como CD45⁺F4/80⁻CD11b^{hi}. Referencias: SSC: *side scatter*, FSC: *forward scatter*.

4.2.2 Validación de métodos para la detección de materiales de la LL

Se validaron métodos para la detección por citometría de flujo de materiales de LL presentes *in vivo* en ratones. Esto incluyó en primer lugar validar el acople de biotina a dichos materiales para posterior detección empleando estreptavidina. Esto se realizó sobre materiales en los que se oxidaron los glicanos mucínicos, así como materiales controles. El trabajo de validación incluyó también la selección de sondas capaces de unirse al material de LL sin biotinar con mínima reactividad con las células y tejidos de ratón.

Así, en primer lugar, se generaron materiales de LL solubilizados (sLL), con los azúcares oxidados por tratamiento con NaIO_4 (sLL- IO_4) y sLL con los glicanos intactos, sometidos solamente al tratamiento control del de oxidación (sLL- BH_4). El tratamiento con NaIO_4 efectivamente oxidó a los glicanos de la LL, lo que impidió la unión de PNA a sLL- IO_4 , sin alterar su unión a sLL- BH_4 (Figura 4.4a). Luego se acopló sLL- BH_4 y sLL- IO_4 a biotina, verificando que el nivel de dicho acople fuera similar entre ambas versiones de sLL. En la Figura 4.4b, se muestra que efectivamente se pudo acoplar biotina a las muestras de sLL y que la cantidad de biotina, evaluada por *dot blot*, fue similar entre sLL- BH_4 y sLL- IO_4 .

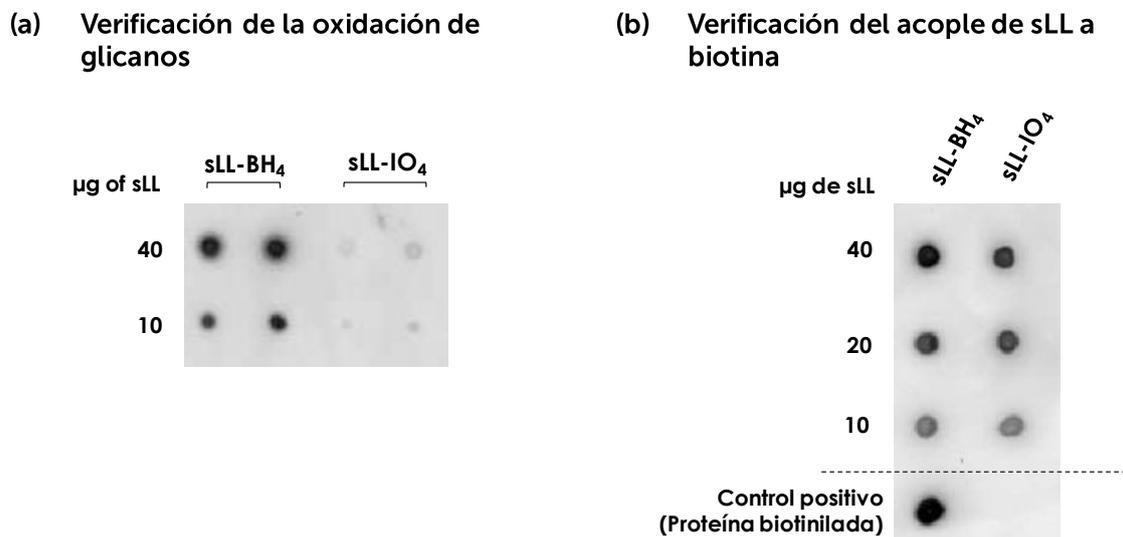


Figura 4.4. Verificación de la oxidación de los residuos monosacáridicos terminales de la LL y de la conjugación de los materiales de la LL a biotina. (a) La efectividad del tratamiento con NaIO_4 se verificó en términos de la pérdida de unión de la lectina PNA a las mucinas de la LL en un ensayo en formato *dot blot*. Se sembró en membrana de nitrocelulosa 3 µl de solución conteniendo 10 a 40 µg de masa seca de LL. Luego de secar las muestras, se bloqueó la membrana con PBS-BSA al 1% m/v, tras lo cual se incubó la membrana con una dilución de PNA-biotina, y se reveló la unión de la misma por incubación con estreptavidina-peroxidasa. (b) Se verificó que la cantidad de biotina conjugada a ambos materiales de la LL (sLL- BH_4 y sLL- IO_4) fuera similar, también empleando un ensayo en formato *dot blot*. Para esto se procedió de forma similar a la explicada previamente, pero tras el bloqueo, se incubó la membrana directamente con estreptavidina-peroxidasa. Como control positivo, se sembró una proteína irrelevante conjugada a biotina.

Como posibles sondas para estudiar la captación de materiales de la LL sin biotinilar (lo que era indispensable para los estudios en contexto de infección), se contaba con PNA, el anticuerpo monoclonal de ratón E492, y la versión recombinante de Clec4F de ratón. Como se describió en la sección 3.1.2 de Materiales y Métodos, las tres sondas reconocen estructuras glucídicas, por lo que ninguna de ellas se podía emplear en los experimentos en los que se utilizara sLL-IO₄. Se evaluó entonces el nivel de reactividad de PNA, E492 y Clec4F recombinante con los tejidos del ratón, así como el potencial de las mismas para detectar los materiales de la LL en experimentos *in vivo*, en particular en la FNPH. Para esto, se inyectaron ratones C57BL/6 WT con sLL-BH₄ o con PBS como control de vehículo, por vía intravenosa, y a las 22 horas se evaluó la señal de las sondas en células de la FNPH permeabilizadas, por citometría de flujo. Como se menciona en la siguiente sección, la inyección intravenosa de este material no es riesgosa para el animal. Se analizó la marca de cada una de las tres sondas en las LSEC, KC, células CD11b⁺ no KC y todas las células restantes de origen hematopoyético (células CD45⁺CD11b⁻F4/80⁻), de los animales controles o inyectados con sLL. Con respecto al nivel de reactividad de las sondas con las células de la FNPH en ratones control, ni PNA ni el anticuerpo E492 mostraron un nivel de unión significativo a las KC o LSEC, los tipos celulares de mayor interés en la Tesis (Figura 4.5).

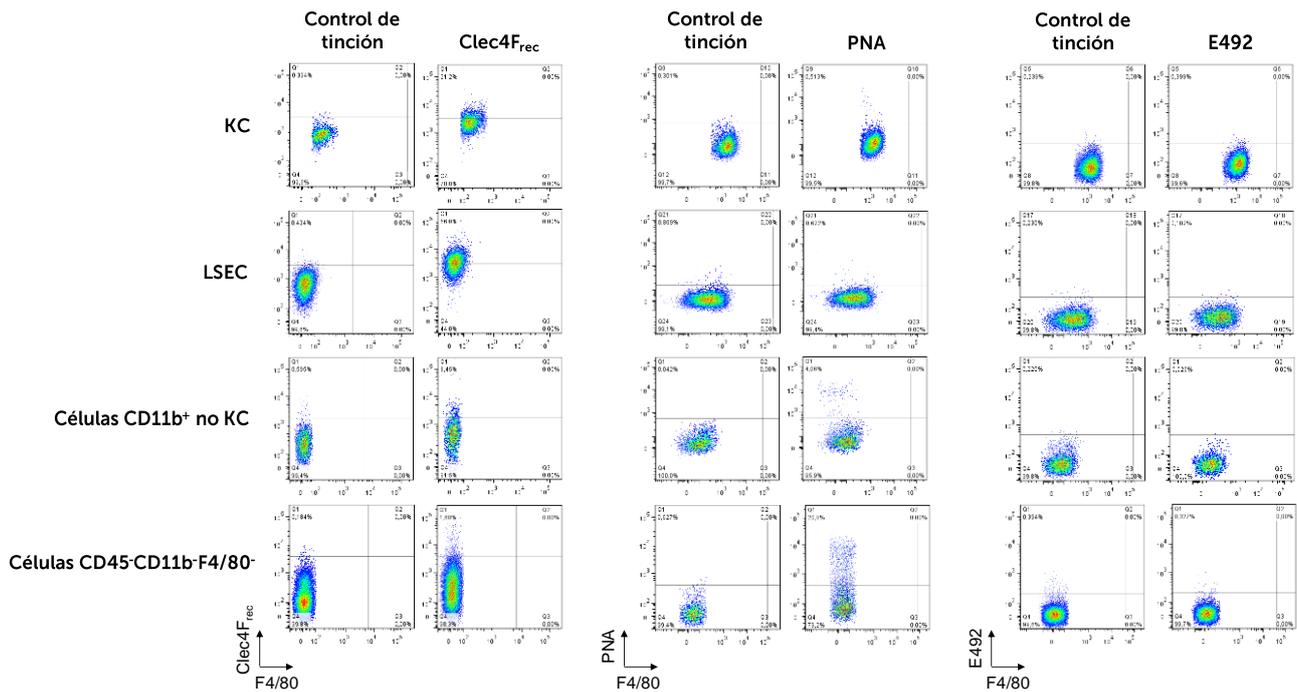


Figura 4.5. Estudio de la reactividad de las sondas para LL, PNA, anticuerpo E492 y Clec4F recombinante, con la FNPH de un ratón control (sin inyectar materiales de la LL). Se inyectó un ratón WT vía intravenosa con 100 μ l de PBS. Luego de 22 horas se sometió al animal a eutanasia, y se analizó por citometría de flujo la reactividad de la lectina PNA, el anticuerpo E492 y de Clec4F recombinante con las células de la FNPH permeabilizadas. Se muestran *dot plots* representativos del resultado obtenido para KC, LSEC, células CD11b⁺ no KC y células CD45⁺CD11b⁻F4/80⁻. El umbral de fluorescencia fue establecido empleando un control de tinción en el cual solo se omitió la sonda utilizada en cada caso, pero agregando el reactivo de detección secundario.

Se observó unión de PNA a una fracción menor de las células CD11b⁺ no KC, mientras que el anticuerpo E492 no se unió a las mismas. Se detectó unión de PNA a una fracción mayor de las células CD45⁺CD11b⁻F4/80⁻, las cuales no eran de particular interés en la presente Tesis, mientras que el anticuerpo E492 no se unió a las mismas. Clec4F recombinante se unió a los cuatro tipos celulares mencionados, principalmente a las LSEC y las KC, lo que la descartó como sonda a emplear en la detección de LL. A continuación, se evaluó la capacidad de PNA y del anticuerpo E492 para detectar LL tras la inyección de sLL-BH₄. Como se observa en la Figura 4.6, ambas sondas permitieron la detección de sLL en KC y LSEC permeabilizadas.

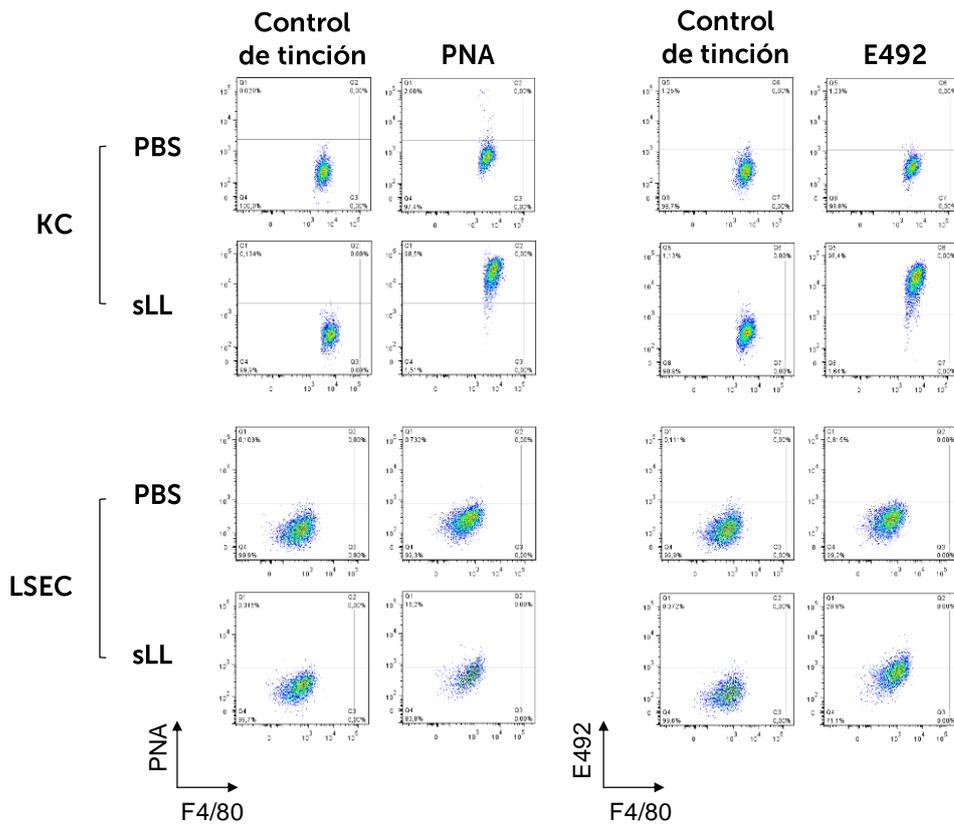


Figura 4.6. Evaluación de la lectina PNA y del anticuerpo E492 como sondas para la detección de materiales de la LL. Se inyectó un ratón WT vía intravenosa con 200 μg de masa seca de sLL-BH₄ o con PBS como control de vehículo. Luego de 22 horas se sometió a los animales a eutanasia, y se cuantificó la internalización de sLL por las células de la FNPH por citometría de flujo de células permeabilizadas, empleando PNA o el anticuerpo E492. Se muestran *dot plots* representativos del resultado obtenido para KC y LSEC. El umbral de fluorescencia fue establecido empleando un control de tinción en el cual solo se omitió la PNA o el anticuerpo E492 biotinilados.

Utilizando a favor las especificidades conocidas de la PNA y del anticuerpo E492, se montó un ELISA de competencia en pos de evaluar, de forma preliminar, la especificidad de Clec4F por los motivos glucídicos de la LL nativa. En este ensayo se hizo competir una concentración fija de Clec4F recombinante con concentraciones variables de PNA o E492 por la unión a sLL (unido a la placa de ELISA). Como se muestra en la Figura 4.7, la unión de Clec4F recombinante a las mucinas de la LL fue competida fuertemente por el anticuerpo E492 pero no por PNA. Estos resultados indican que Clec4F se uniría al motivo P1 de las mucinas de la LL, y no al antígeno T. La unión al motivo P1 es consistente con resultados reportados en usando Clec4F recombinante y glicanos sintéticos¹⁰⁵. La

ausencia de unión al antígeno T en nuestro ensayo de competencia contrasta con resultados de ensayos con arreglos de glicanos sintéticos, en los cuales Clec4F recombinante sí se unió este determinante^{116,119,127}. Este contraste sugiere que, en el contexto de las mucinas de la LL, el antígeno T no estaría expuesto o, de estarlo, no tendría una disposición espacial adecuada para el reconocimiento por Clec4F.

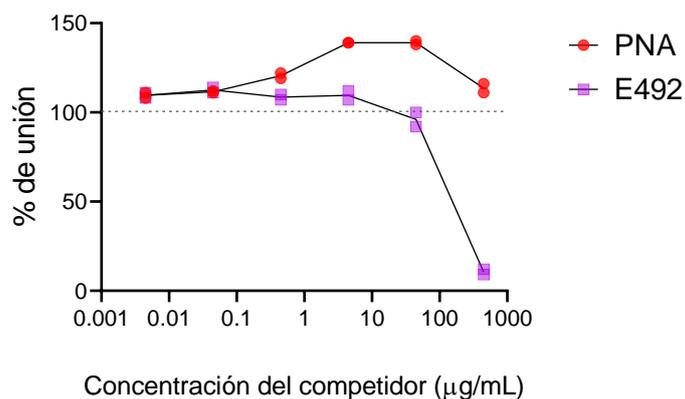


Figura 4.7. Clec4F se une al motivo P1 de los glicanos mucínicos de la LL de *E. granulosus*. Se ensayó la especificidad de Clec4F por motivos glucídicos de la LL nativa a través de un ELISA de competencia, en el cual se sometieron a competencia por la unión a las mucinas de la LL, a PNA o E492 con Clec4F recombinante. Los resultados se expresan en relación a la unión de Clec4F a sLL ausencia del competidor. Se muestran los datos de duplicados analíticos.

4.2.3 Estudio de la captación de mucinas de la LL solubles por las células presentes en la FNPH.

Como primera aproximación para evaluar la interacción de las mucinas de la LL con las KC *in vivo*, se trabajó con una preparación solubilizada de la fracción mucínica de la LL (sLL). Si bien hasta el inicio de este trabajo experimental no se contaba con evidencias en cuanto a la inocuidad de sLL inyectado vía intravenosa, *a priori* no se esperaban efectos adversos, ya que este material es producido en condiciones de esterilidad y de exclusión de pirógenos. Además, como se muestra en la Figura 4.8, se determinó el radio hidrodinámico de la preparación por dispersión dinámica de luz, resultando éste ser de unos 15 nm aproximadamente. Este tamaño está muy por debajo del tamaño mínimo recomendado para preparaciones a inyectar por vía intravenosa en ratones, que es 500 nm¹⁷².

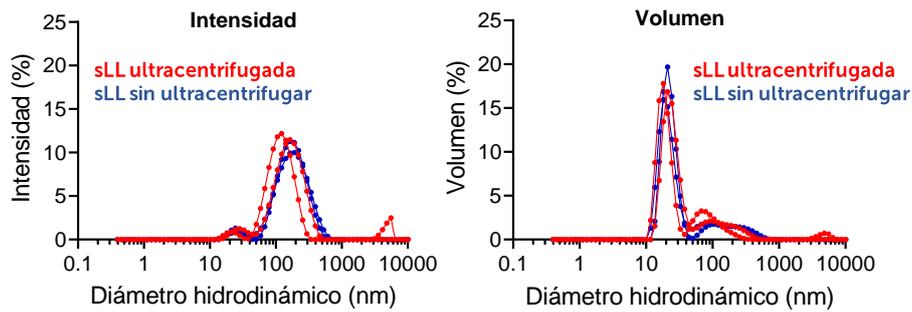


Figura 4.8. Análisis de dispersión dinámica de luz (DLS) de sLL. Se analizó en el equipo Zeta-sizer nanoS (Malvern) sLL libre de $InsP_6$ cálcico por incubación previa con EDTA y conteniendo los anticuerpos bovinos (proteínas provenientes del hospedero). Se muestran datos para el sobrenadante del material ultracentrifugado 1 h a 100.000 g y el material no ultracentrifugado, que no presentan diferencias. Cada medida del análisis fue realizada por duplicado, y se muestran los valores promedios de estos duplicados, en términos de intensidad de señal (medida que sobreestima la importancia de las especies de mayor diámetro hidrodinámico; izquierda) y de volumen (medida más indirecta pero que refleja mejor la cantidad de material en cada rango de tamaño; derecha). Las medidas de las muestras fueron realizadas por el MSc. Federico Carrión del Laboratorio de Inmunovirología del Institut Pasteur de Montevideo.

En primera instancia, se buscó determinar si las KCs podían captar sLL *in vivo*, y en caso de existir dicha captación, evaluar si la misma dependía de la integridad de los glicanos mucínicos de la LL. Para esto se inyectaron lotes de ratones C57BL/6 vía intravenosa con sLL-BH₄, sLL-IO₄ biotiniladas, o PBS como control de vehículo. Luego de 20 minutos se sometieron a los animales a eutanasia y se analizó la FNPH por citometría de flujo. Se cuantificó la señal de sLL en estas preparaciones celulares, luego de la permeabilización celular, por revelado con estreptavidina conjugada al fluoróforo ficoeritrina.

Como se muestra en la Figura 4.9, se observó que las KCs captaron sLL-BH₄, tanto a nivel de porcentaje de células positivas como en términos de la intensidad de fluorescencia promedio de la señal (del inglés, *mean fluorescence intensity-MFI*), mientras que la señal correspondiente al material sLL-IO₄ en las KCs fue apenas detectable. Por otro lado, no se observó señal correspondiente a sLL en las LSECs ni en las células CD11b⁺ no KC, y como es esperado tampoco en ninguno de los tipos celulares mencionados en los animales inyectados con PBS. Estos datos mostraron que la captación de materiales de la LL por KCs depende de la integridad de los glicanos de las mucinas de la LL.

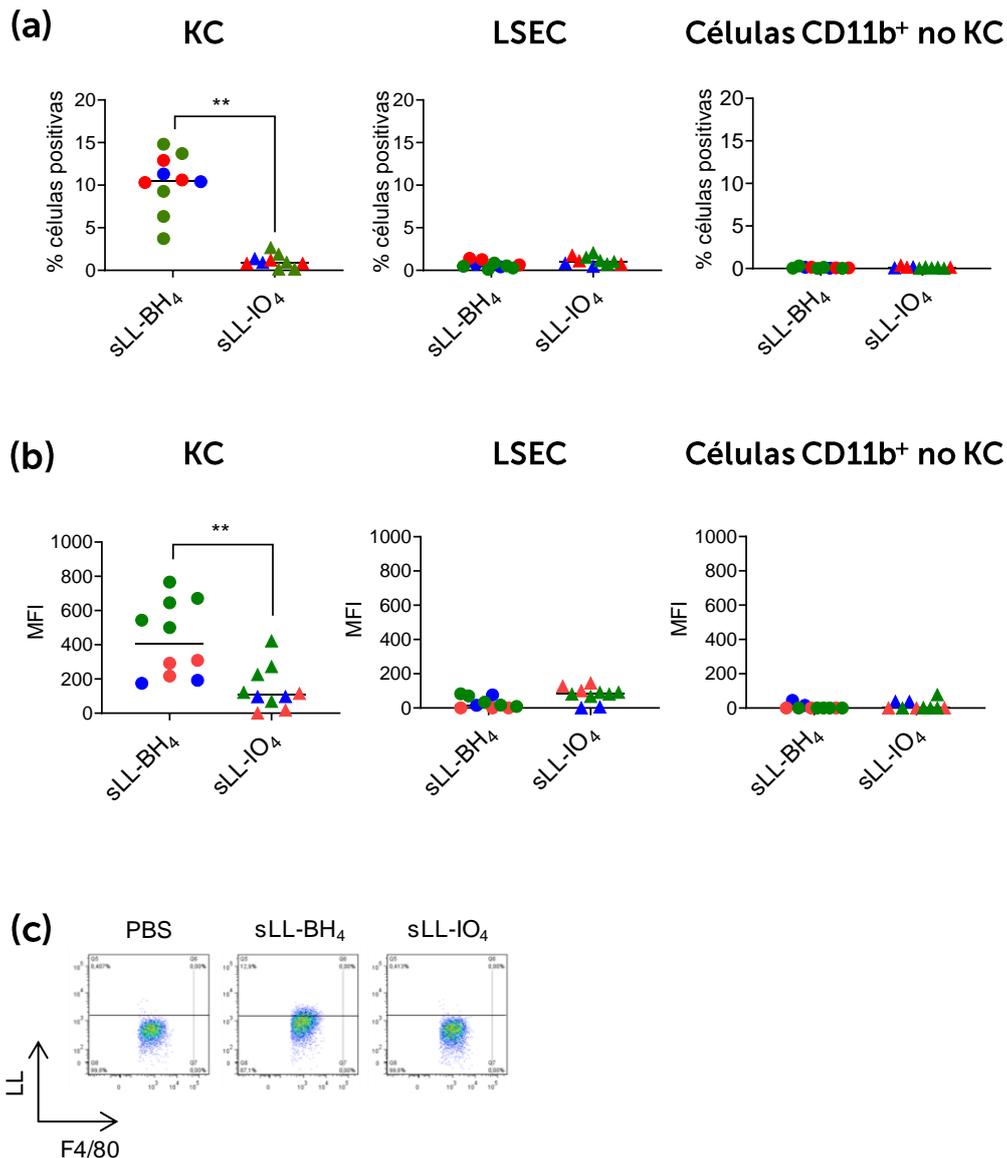


Figura 4.9. Las KC captan sLL en forma dependiente de la integridad de los glicanos mucínicos.

Se inyectaron ratones C57BL/6 vía i.v. con 100 μ g de masa seca de una preparación de LL solubilizada y marcada con biotina, tratada con periodato para oxidar a los residuos monosacarídicos terminales (sLL-IO₄) o sometida a tratamiento control (sLL-BH₄). Luego de 20 minutos se sometieron a los animales a eutanasia y se analizó la incorporación de sLL por las células de la FNPH permeabilizadas usando estreptavidina-PE (a y b). Se muestran los datos de captación por las KC, las LSEC y las células CD11b⁺ no KC, en términos de porcentaje de células positivas (a) y del promedio geométrico de la intensidad de fluorescencia (del inglés, *Mean Fluorescence Intensity, MFI*) (b). (c) Se muestran *dot plots* representativos para la captación por KC. El umbral de la señal para cada tipo celular fue determinado usando la señal correspondiente a las células de los ratones inyectados con control de vehículo (PBS), sometidas a la misma tinción que la de los animales inyectados con sLL. Los datos de intensidad de fluorescencia graficados incluyen la sustracción de la mediana de los valores correspondientes a los ratones inyectados con vehículo. Se muestran los datos de tres experimentos independientes (representados en distintos colores) y los valores de los ratones individuales con su mediana. El análisis estadístico fue realizado desde los datos crudos por el test de Mack-Skillings.

Si bien los resultados anteriores eran compatibles con la captación de sLL por KC mediante Clec4F, no era posible descartar la participación de otra(s) lectina(s) expresadas en las KC. Esto volvía relevante estudiar la captación de sLL en animales WT y *Clec4f*^{-/-}. Pevio a la realización de experimentos con animales *Clec4f*^{-/-}, se corroboró la ausencia de la proteína en estos ratones (Figura 4.10).

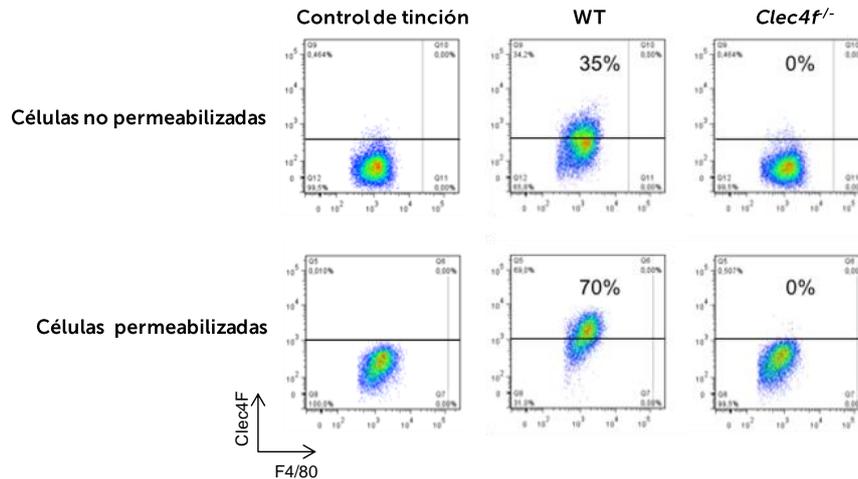
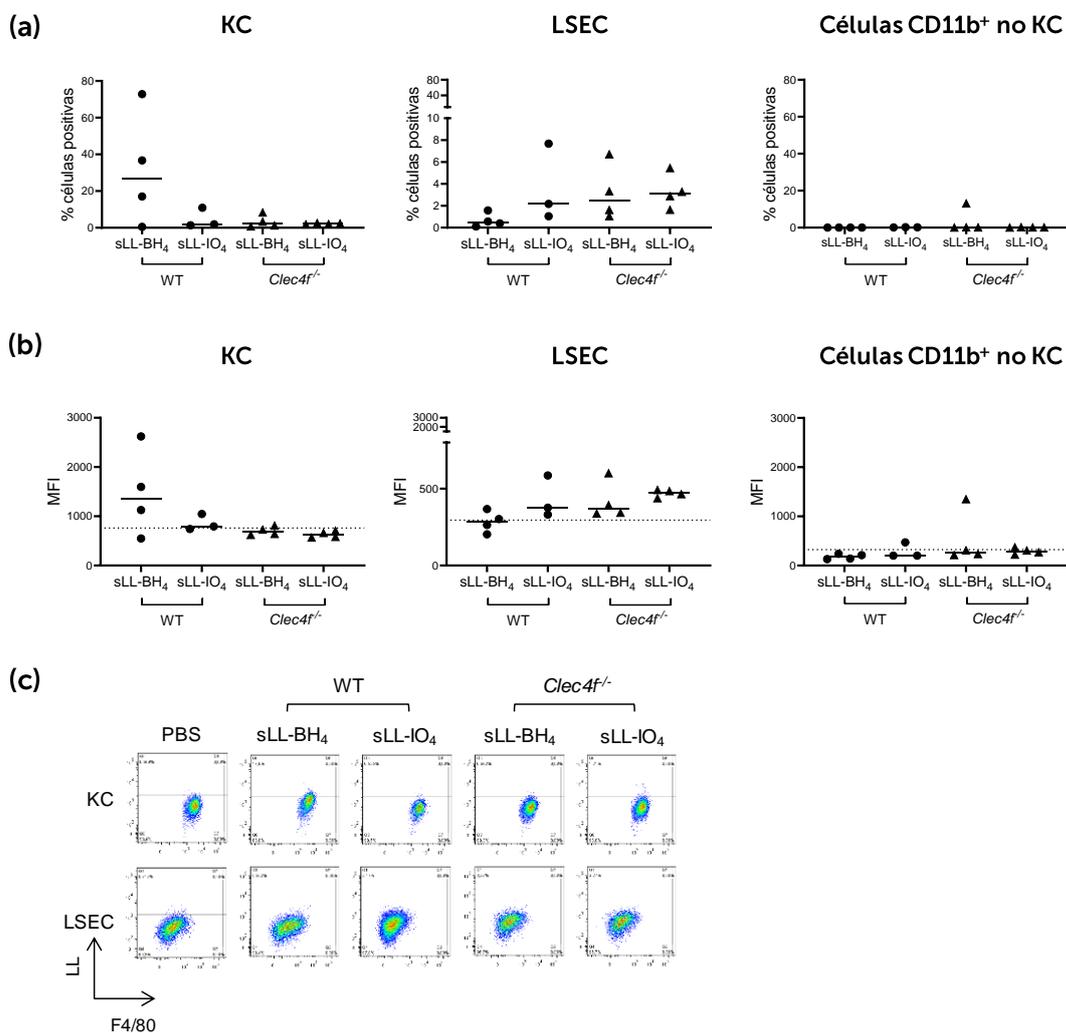


Figura 4.10. Verificación de la ausencia de Clec4F en los ratones *Clec4f*^{-/-}. Se obtuvo la FNPH de ratones *Clec4f*^{-/-} y WT y se analizó sobre la misma la expresión de Clec4F por citometría de flujo en células con y sin permeabilización. Se definió a las KC como en la Figura 4.3. Los controles de tinción contenían todos los anticuerpos conjugados a fluoróforos pero carecían del anticuerpo primario anti-Clec4F.

Para evaluar el papel de Clec4F en la internalización de los materiales de la LL por las KCs, de forma similar a lo previamente descrito, se inyectaron vía intravenosa ratones WT y *Clec4f*^{-/-} con sLL-BH₄, sLL-IO₄ o PBS, y se analizó su captación luego de 20 minutos. En pos de aumentar la sensibilidad para la detección de materiales de LL, en lugar de inyectar 100 µg/ratón, se inyectaron 200 µg/ratón de las distintas preparaciones de sLL. Nuevamente se observó captación de sLL-BH₄ por KC, la cual se anuló casi totalmente cuando los glicanos de la LL estaban oxidados (Figura 4.11), corroborando la observación anterior de que la captación de sLL por KC depende de la integridad de los glicanos mucínicos del material. Además, se observó que los valores de las medianas de la captación de sLL-BH₄ por las KC, en término de porcentaje de células positivas, eran efectivamente mayores al inyectar 200 µg de sLL-BH₄ (25 %) que inyectando 100 µg del mismo material (10 %). Interesantemente, la captación de sLL-BH₄ por KCs se anuló en animales *Clec4f*^{-/-}, aportando la primera evidencia de que Clec4F es necesario para la

captación de material de LL con glicanos intactos. Además se observó, a nivel de una ligera tendencia, que cuando no había captación por KC (por ausencia de *Clec4F*), había cierto nivel de incorporación por LSEC. Esta incorporación no pareció ser dependiente de los glicanos de la LL, ya que los niveles de captación de sLL-BH₄ o sLL-IO₄ por las LSECs de animales *Clec4f*^{-/-} no parecieron ser diferentes entre sí. Este no es un resultado obvio, dado que las LSECs expresan una gran batería de lectinas diferentes^{136,144}, pero podría explicarse si las LSEC no expresan ninguna lectina con especificidad por los azúcares de la LL. Nuevamente, no se detectó captación de sLL por las células CD11b⁺ no KC.



Ver leyenda de Figura 4.11 en la siguiente página.

Figura 4.11. La captación temprana de sLL por KC depende de la integridad de los glicanos mucínicos y de Clec4F. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT o *Clec4f^{-/-}* vía i.v. con 200 µg de masa seca de una preparación de sLL-BH₄ o sLL-IO₄, ambas marcadas con biotina. Luego de 20 minutos se sometieron a los animales a eutanasia y se analizó la incorporación de sLL por las células de la FNPH permeabilizadas usando estreptavidina-PE (a y b). Se muestran los datos de captación por las KC, las LSEC y las células CD11b⁺ no KC, en términos de porcentaje de células positivas (a) y del promedio geométrico de la intensidad de fluorescencia (b). (c) Se muestran *dot plots* representativos para la captación por KC y LSEC. El umbral de la señal para cada tipo celular fue determinado como en la Figura 4.9. Los datos de intensidad de fluorescencia graficados contemplan la sustracción de la mediana de los valores correspondientes a los ratones inyectados con vehículo. Se muestran los datos de un único experimento con los valores de los ratones individuales con su mediana. No se realizó análisis estadístico de este experimento dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

A continuación, se inyectaron grupos de ratones WT y *Clec4f^{-/-}* vía intravenosa con 200 µg de sLL-BH₄, sLL sin tratar (material en condiciones nativas) o PBS solamente, y se analizó la FNPH. Con este experimento se buscaba por un lado obtener evidencia confirmatoria sobre el papel de Clec4F en la captación de materiales de la LL, y por otro averiguar si las preparaciones sLL-BH₄ y sLL sin tratar se comportaban de forma similar. Si bien *a priori* ambas preparaciones de sLL podrían ser equivalentes, datos obtenidos por el grupo han evidenciado que el tratamiento con borohidruro remueve en parte las inmunoglobulinas unidas específicamente a la LL y que provienen de la respuesta inmune a la hidátide del hospedero intermediario del que se obtuvo el material (en este caso, bovino)^{69,72,74}. La presencia de estas inmunoglobulinas en la LL podría condicionar la capacidad de las KC de internalizar ambos materiales de sLL, ya que las mismas podrían mediar cierto nivel de captación a través de receptores Fc, volviendo el análisis menos limpio. Dado que en estos ensayos no se empleó sLL-IO₄ (que no es reconocida por lectinas), se analizó la presencia de sLL en las células de la FNPH mediante tinción con PNA biotinilada, seguida por estreptavidina marcada fluorescentemente.

En la Figura 4.12 se muestran los resultados de estos experimentos. En primer lugar, se observó que la detección con PNA biotinilada es más sensible que el método previo que empleaba detección de sLL biotinilada. Usando PNA se logró detectar hasta un 95 % de KC sLL⁺ en comparación con los experimentos previos con la misma dosis, en los cuales el máximo alcanzado era del entorno del 25 % de KC sLL⁺. Con respecto al papel de Clec4F en la captación de materiales de LL, se observó que ambas preparaciones de sLL

fueron internalizadas por las KC, y que esta captación fue significativamente mayor en los ratones WT que en los ratones *Clec4f*^{-/-} (particularmente cuando se observan los datos en términos de *MFI*), evidenciando nuevamente la participación de Clec4F en la captación de sLL por KC. Por otro lado, la mayor sensibilidad para la detección de sLL que permite la PNA hizo posible observar que existe incorporación de sLL independiente de Clec4F en las KC. En los animales *Clec4f*^{-/-}, esta incorporación tendió a ser menor para sLL sometida a tratamiento control (sLL-BH₄) que en sLL sin tratar. Esta tendencia hacia menor captación de sLL-BH₄ podría correlacionarse con la menor cantidad de anticuerpos presente en esta muestra de LL, ya que como se mencionó previamente, el tratamiento con borohidruro remueve en parte a los anticuerpos unidos específicamente. Esto sugiere que la sLL sin tratar podría, en efecto, ser captada por las KC vía receptores Fc, además de por Clec4F, quedando este otro posible mecanismo de captación oculto cuando está presente la interacción dominante con Clec4F.

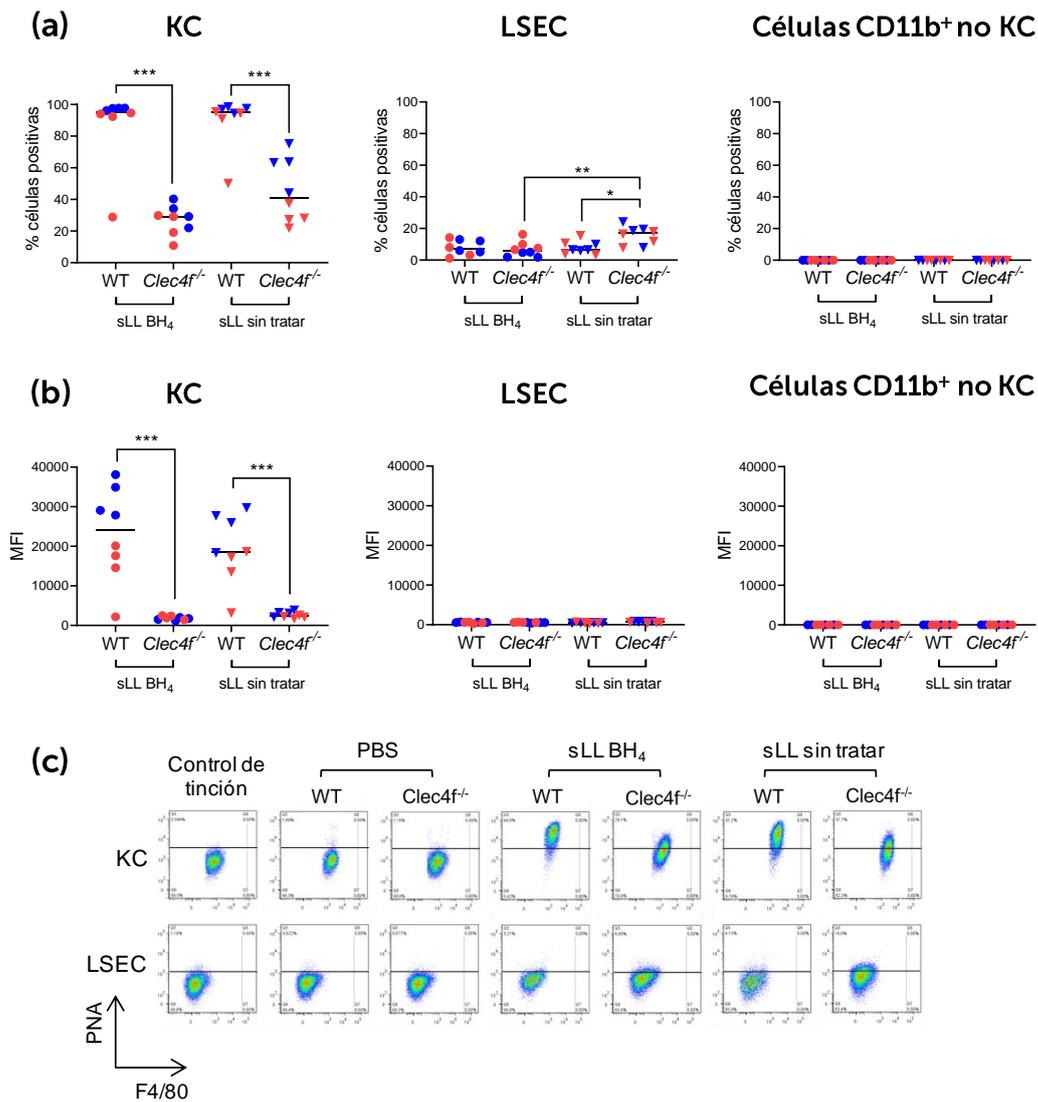


Figura 4.12. La captación temprana de sLL por KC depende en gran medida de Clec4F. Se inyectaron ratones WT y *Clec4f*^{-/-} con 200 µg de masa seca de sLL, sometida a tratamiento control (sLL-BH₄) o sLL nativa (sLL sin tratar) o vehículo solamente (PBS). Luego de 20 minutos se sometieron a los animales a eutanasia y se cuantificó la internalización del material en las poblaciones celulares de la FNPH por citometría de flujo de células permeabilizadas, usando PNA como sonda. Se muestran los resultados para KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC en términos de células positivas (a) y de intensidad promedio de fluorescencia (MFI) (b). Se muestran *dot plots* representativos para KC y LSEC (c). El umbral de fluorescencia se estableció en base a los datos de los ratones inyectados con PBS. Se muestran los datos de ratones individuales correspondientes a dos experimentos independientes, representados en azul y rojo, y las medianas de los dos experimentos en conjunto. Para el análisis estadístico se empleó el test de Mack-Skillings con post-test de Conover y corrección de Benjamini y Hochberg para comparaciones múltiples.

La mayor sensibilidad de la tinción con PNA también permitió detectar captación de sLL por las LSECs, aunque a un nivel bajo, y como es de esperarse, de forma independiente

de Clec4F. De hecho, para sLL sin tratar se observó una mayor captación en LSEC de animales *Clec4f*^{-/-} que en WT, posiblemente como resultado de la disminución de la captación por KC. No se detectó sLL en las células CD11b⁺ no KC. En los animales *Clec4f*^{-/-}, en forma similar a lo mencionado para KC pero alcanzando en este caso significancia estadística, se observó mayor internalización por LSEC de sLL sin tratar que de sLL-BH₄, lo que nuevamente estaría de acuerdo con la posibilidad de captura de sLL dependiente por receptores Fc¹³⁶. En vista de estos resultados, y en línea con los resultados mostrados en las Figuras 4.9 y 4.11, se decidió elegir como material para los futuros experimentos a sLL sometida a tratamiento control (sLL-BH₄).

A través de un cálculo que tiene en cuenta los números de células correspondientes a cada tipo celular que capta sLL y la intensidad de la señal de sLL intracelular, se estimó que las KC son el tipo celular principal en la internalización de sLL dentro de los tipos celulares de la FNPH analizados, tanto en ratones WT como en *Clec4f*^{-/-} (Figura 4.13). Con respecto a las LSEC, se observó que en ausencia de Clec4F, estas células parecen jugar un papel más importante en la internalización de sLL que en presencia del receptor, aunque esta contribución sigue siendo mucho menor que la de las KC.

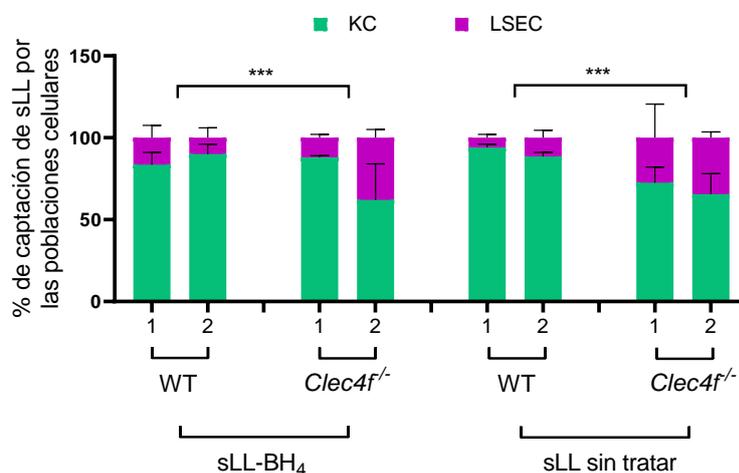


Figura 4.13. Las KC son las principales células dentro de la FNPH en términos de captación temprana de sLL. Se estimó de forma aproximada, como se explica en la sección Materiales y Métodos, la contribución de los tipos celulares presentes en la FNPH a la captación de sLL luego de 20 minutos de inyección. Se grafica la contribución por KC y LSEC en términos de las medianas generales con su desvío estándar, de dos experimentos, 1 y 2, que se corresponden a los experimentos mostrados en la Figura 10 como azul y rojo, respectivamente. Se utilizó el test estadístico de Mack-Skillings para comparar la fracción de sLL captada por KC en los animales WT y *Clec4f*^{-/-}.

Es esperable que en ausencia de Clec4F puedan evidenciarse otros mecanismos para la internalización celular de sLL, como pueden ser macropinocitosis o la internalización dependiente de anticuerpos naturales o complemento. Ya que también era esperable que tales mecanismos tuvieran más peso a tiempos más largos de análisis, se realizaron experimentos similares a los descritos previamente, pero con un tiempo final de 22 horas en lugar de 20 minutos. Como se observa en las Figuras 4.14 y 4.15, en estas condiciones las KC permanecieron siendo el tipo celular (de los analizados) principal en captar sLL, y esta captación también fue fuertemente dependiente de Clec4F. Con respecto a las LSEC, en ausencia de Clec4F, estas células contribuyeron ligeramente en mayor medida a la captación de sLL que en presencia del receptor, pero aun así esta contribución continuó siendo marginal. De igual manera que en los experimentos previos, no se detectó captación de sLL por las células CD11b⁺ no KC.

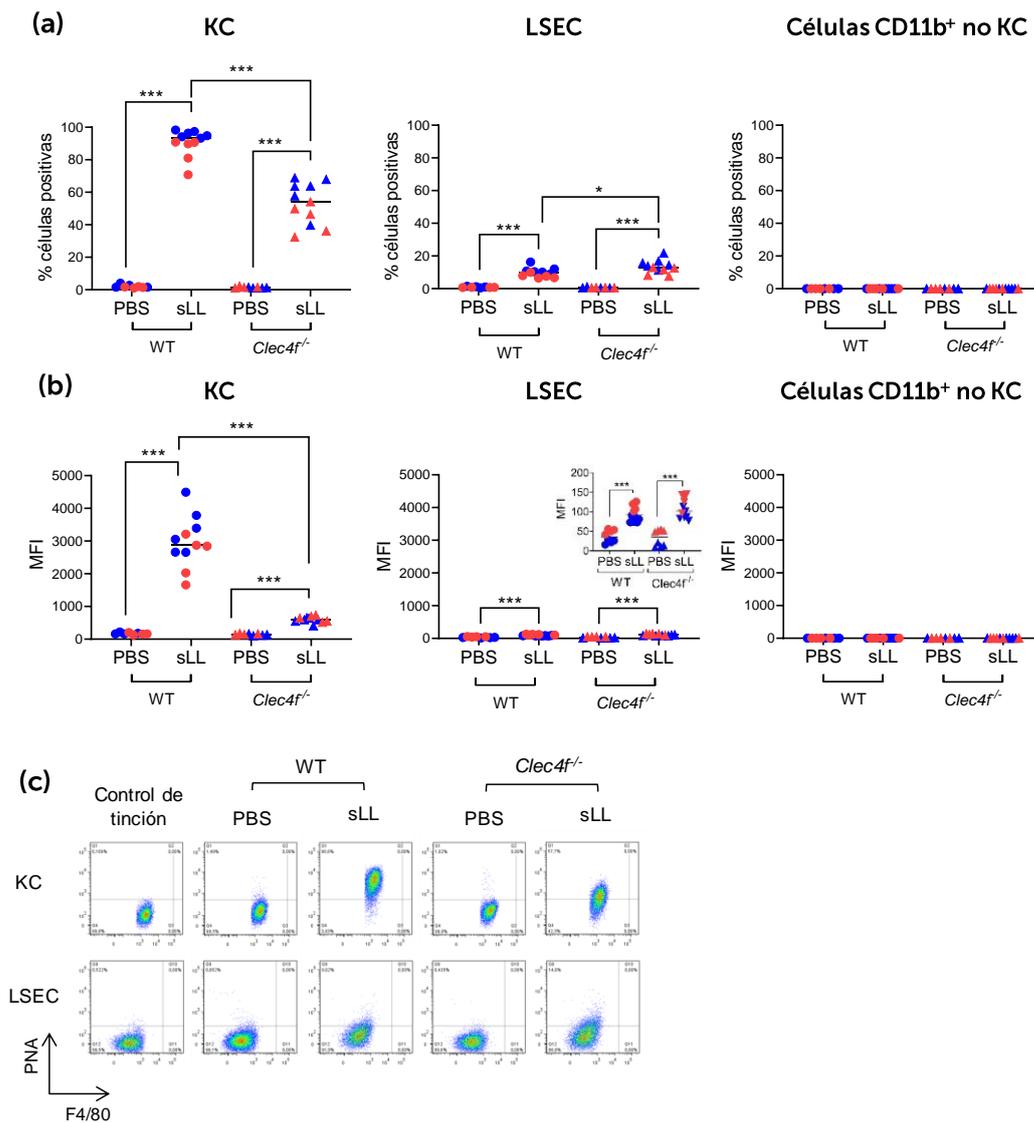


Figura 4.14. *Clec4F* continúa siendo importante en la captación de sLL por KC a tiempos de incorporación del orden de un día. Se inyectaron ratones WT y *Clec4f*^{-/-} vía i.v. con 200 ug de masa seca de sLL-BH₄ por ratón o PBS como control de vehículo. Luego de 22 horas se sometió a los animales a eutanasia y se cuantificó la internalización de sLL por las células de la FNPH por citometría de flujo de células permeabilizadas, empleando PNA como sonda. Se muestran los resultados para KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC en términos de porcentaje de células positivas (a) y de *MFI* (b). Para los datos de LSEC en términos de *MFI*, se incluye una gráfica con escala ampliada. El umbral de fluorescencia se estableció empleando un control de tinción en el cual solo se omitió la PNA biotinilada. (c) Se muestran *dot plots* representativos para la señal en KC y LSEC. Se grafican los datos de dos experimentos independientes (con diferentes colores), mostrando los valores de los ratones individuales y las medianas generales. El análisis estadístico fue realizado mediante el test de Mack-Skillings con post-test de Conover y corrección de Benjamini y Hochberg para comparaciones múltiples.

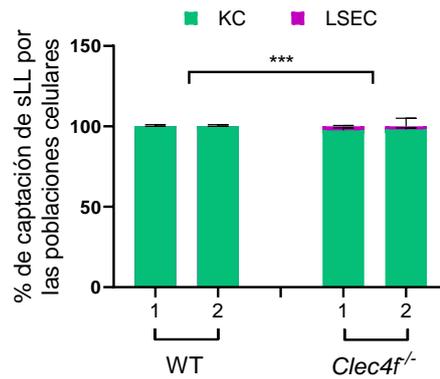


Figura 4.15. Las KC también son el tipo celular principal de la FNPH en captar sLL a tiempos de incorporación del orden de un día. Se estimó, como se explica en la sección Materiales y Métodos, la contribución de los tipos celulares presentes en la FNPH a la captación de sLL luego de 22 horas de inyección. Se grafica la contribución de KC y LSEC en términos de las medianas generales con su desvío estándar, de dos experimentos, 1 y 2, que se corresponden a los experimentos mostrados en la Figura 4.14 como azul y rojo, respectivamente. Se utilizó el test estadístico modificado de Wilcoxon-Mann Whitney para comparar la fracción de sLL captada por KC en los animales WT y *Clec4f*^{-/-}.

Para verificar que efectivamente la señal detectada de los materiales de la LL se debía a la internalización celular y no a la unión de materiales a la superficie de las células, se inyectó sLL y se realizó la tinción del material en ausencia de permeabilización celular, comparando dicha señal con la obtenida tras la permeabilización. Como se muestra en la Figura 4.16, la señal de sLL en las KC provino mayoritariamente del interior celular y no de la superficie, confirmando entonces la internalización de los materiales de la LL por KC.

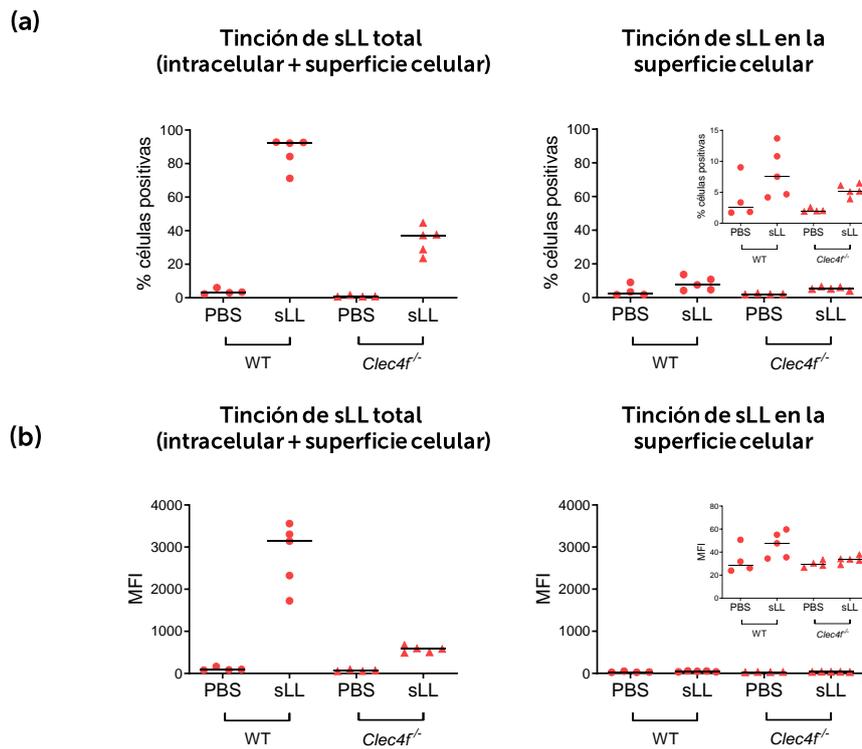


Figura 4.16. El nivel de unión de sLL en la superficie de las KC es despreciable en comparación con su internalización. Se inyectaron ratones WT y *Clec4f*^{-/-} vía i.v. con 200 µg de masa seca de sLL-BH₄ por ratón o PBS como control de vehículo. Luego de 22 horas se sometieron a los animales a eutanasia y se cuantificó la señal de sLL en KC por citometría de flujo de células con y sin permeabilización, lo cual permitió evaluar la marca de sLL total (intracelular y en superficie celular) o solamente a nivel de la superficie celular, respectivamente, empleando PNA como sonda. Se muestran los resultados para KC en términos de porcentaje de células positivas (a) y de *MFI* (b). Para los datos correspondientes a las células sin permeabilizar, se incluyen gráficas con escala ampliada. El umbral de fluorescencia fue establecido empleando un control de tinción en el cual solo se omitió la PNA biotinilada. Se grafican los datos correspondientes a un único experimento (correspondiente al experimento representado con puntos rojos de la Figura 4.14), mostrando los valores de los ratones individuales y las medianas. No se realizó análisis estadístico de este experimento dado el bajo número de ratones del grupo experimental.

Se evaluó si la internalización de los materiales de la LL por las KC, a través de Clec4F, era capaz de inducir sobre estas células un aumento en la expresión del propio receptor. Como se muestra en la Figura 4.17, al menos a las 22 horas post-inyección de sLL, no se observó un aumento en la expresión de Clec4F ni en la superficie ni en el interior celular.

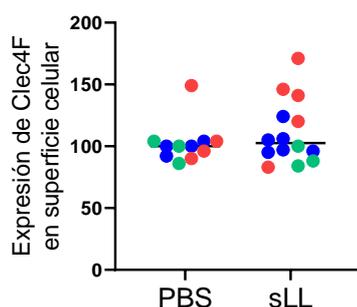


Figura 4.17. La expresión de Clec4F en la superficie de las KC no cambia tras la inyección de sLL. Se inyectaron ratones WT C57BL/6 con sLL o vehículo solamente (PBS), como se describió en la Figura 4.14, y luego de 22 horas se analizó la expresión de Clec4F en superficie por citometría de flujo. Se muestran los datos de tres experimentos independientes (en colores diferentes), en términos de *MFI*. Los datos se normalizaron sobre el valor de la mediana de los ratones inyectados con PBS en cada experimento.

En suma, las mucinas solubles de la LL inyectadas vía intravenosa llegan al hígado y, dentro de la FNPH, son captadas en forma mayoritaria por las KC y de forma dependiente principalmente de Clec4F.

4.2.4 Estudio de la captación de materiales de la LL inyectados en formato particulado por parte de las células presentes en el hígado.

Como se mencionó previamente, en la equinococosis quística en humanos se detectan materiales de la LL de naturaleza particulada, tanto en el sitio de infección como en ganglios drenantes⁹¹. Este antecedente llevó a estudiar si las KCs, y en particular Clec4F, también participan en la captación de una preparación particulada de mucinas de la LL inoculada en un sitio distante del hígado. Para ello, se inyectaron lotes de ratones C57BL/6 con 450 μ g de una preparación particulada de la LL (pLL-BH₄), sometido a tratamiento con borohidruro, por coherencia con los experimentos anteriores con sLL, o PBS como control de vehículo, por vía intraperitoneal. Se eligió esta vía de inoculación en lugar de la intravenosa, ya que la inyección de pLL intravenosa supondría un riesgo de vida para los animales dado el tamaño de las partículas presentes en la preparación (que tienen entre decenas y centenas de μ m en su dimensión mayor)⁹³. En este modelo se aumentó la dosis de mucinas inyectadas por ratón con respecto a los ensayos con sLL (450 μ g vs 200 μ g), debido a que se esperaba a que solo una fracción pequeña del

material inyectado en la cavidad peritoneal alcanzara la circulación. Por datos previos del grupo, se conocía que la dosis de pLL inyectada no es letal, habiéndose llegado a probar una dosis de 900 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. Luego de 22 horas se analizó la FNPH por citometría de flujo, usando PNA para revelar la presencia de LL.

Como se muestra en la Figura 4.18, de forma similar a lo observado para la internalización de sLL, se detectó captación de pLL por las KC en forma dependiente de Clec4F, así como también se observó un nivel apreciable de captación en forma independiente del receptor. En línea con lo observado para sLL, las LSEC también internalizaron pLL a un bajo nivel. Por otro lado, a diferencia de lo observado para los ensayos de captación de sLL, se observó internalización de pLL por células CD11b⁺ no KC. Si bien estas células posiblemente comprendan monocitos, otros macrófagos y neutrófilos reclutados al hígado, no se observó que la frecuencia de esta población dentro de las células de la FNPH aumentara como resultado de la inyección de pLL (Figura 4.19).

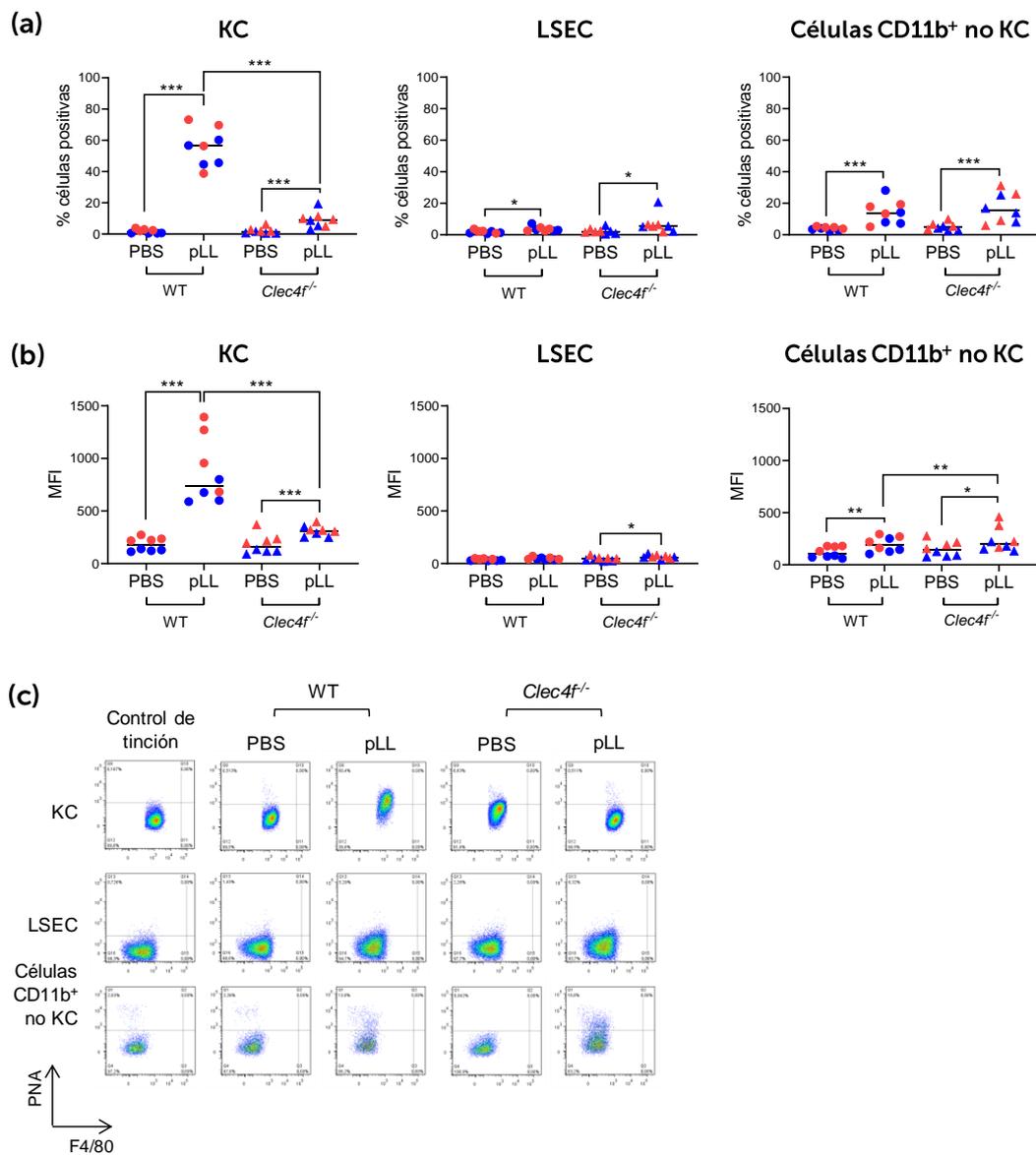


Figura 4.18. La internalización por KC de una preparación particulada de mucinas de la LL (pLL) depende en gran medida de Clec4F (I). Se inyectaron ratones C57BL/6 WT y *Clec4F^{-/-}* vía intraperitoneal (i.p.) con 450 μ g de masa seca de pLL o PBS como control de vehículo. Luego de 22 horas, se sometieron a los animales a eutanasia y se cuantificó la captación de pLL por las células de la FNPH, luego de la permeabilización de las mismas, por citometría de flujo empleando PNA como sonda. Se muestran los resultados para KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC en términos de porcentaje de células (a) y de *MFI* (b), así como *dot plots* representativos para cada tipo celular (c). El umbral de fluorescencia se determinó empleando controles de tinción como en la Figura 4.14. Se muestran los datos de ratones individuales de dos experimentos independientes, mostrados en colores diferentes y las medianas de los dos experimentos en su conjunto. El análisis estadístico fue realizado mediante el test de Mack-Skillings con post-test de Conover y corrección de Benjamini y Hochberg para comparaciones múltiples.

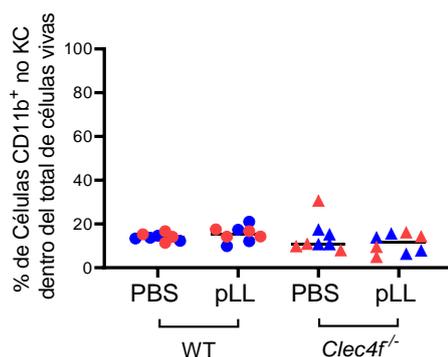


Figura 4.19. La inyección de pLL no aumenta la frecuencia de las células CD11b⁺ no KC dentro del total de las células de la FNPH. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT y *Clec4f*^{-/-} vía i.p. con 450 µg de masa seca de pLL o PBS como control de vehículo. Luego de 22 horas, se sometieron a los animales a eutanasia y determinó la frecuencia de las células CD11b⁺ no KC dentro de las células vivas. Se muestran los datos de ratones individuales de dos experimentos independientes (mostrados en las Figuras 4.18 y 4.21), mostrados en colores diferentes, y los valores de las medianas de los dos experimentos en su conjunto. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mack-Skillings.

Como era de esperarse, tanto para las LSECs como para las células CD11b⁺ no KC, la captación de pLL fue independiente de Clec4F, y se observó una tendencia a mayor captación en ausencia de Clec4F. De acuerdo con esto, a través de un cálculo análogo al empleado en las Figuras 4.13 y 4.15, se estimó que en los animales WT la gran mayoría de la captación de pLL por las células de la FNPH fue realizada por las KCs, mientras que en los *Clec4f*^{-/-} se evidenciaba la contribución, minoritaria, de las LSECs junto con las células CD11b⁺ no KC (Figura 4.20).

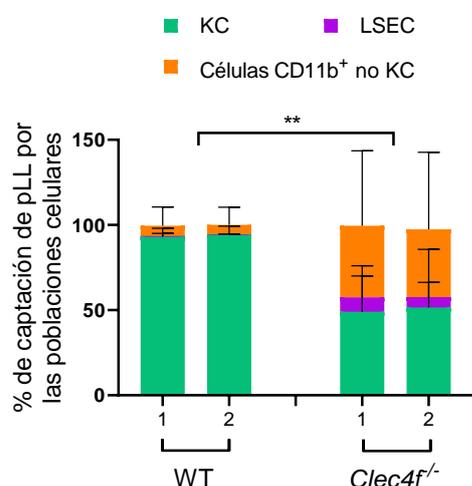


Figura 4.20. Las KC son el tipo celular principal de la FNPH en captar pLL (I). Se estimó, como se explica en la sección Materiales y Métodos, la contribución de los tipos celulares presentes en la FNPH a la captación de pLL luego de 22 horas de inyección (empleando PNA como sonda). Se grafica la contribución por KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC en términos de las medianas generales con su desvío estándar, de dos experimentos, 1 y 2, que se corresponden a los experimentos mostrados en la Figura 4.18 como azul y rojo, respectivamente. Se utilizó el test estadístico de Mack-Skillings para comparar la fracción de pLL captada por KC en los animales WT y *Clec4f*^{-/-}.

Como se muestra en la Figura 4.5, la PNA reconoce ligandos presentes en algunos tipos celulares de la FNPH (células CD11b⁺ no KC y células definidas como CD45⁺, F4/80⁺, CD11b⁻) aún en ausencia de LL. Por lo tanto, esta sonda presenta limitaciones, y en particular dificulta el análisis de la contribución a la captación de las células CD11b⁺ no KC al sobrestimar la misma. Es en este contexto que surgió la posibilidad de emplear el anticuerpo de ratón monoclonal E492 biotinilado. E492, que reconoce específicamente glicanos terminados en el motivo trisacárido Gal α 1-4 Gal β 1-4 GlcNac⁵², tiene, como se mostró en la Figura 3, mínima reactividad con las células de ratón de interés, por lo que permite obtener tinciones más limpias, y por lo tanto datos más confiables.

Al emplear el anticuerpo E492 (Figura 4.21) y analizar la captación de pLL en forma análoga a lo mostrado en la Figura 4.18, se confirmaron los datos obtenidos con la tinción con PNA en cuanto a que las KCs son el tipo celular predominante en la captación y a que ésta depende mayoritariamente de Clec4F. Además, con esta tinción más sensible, se observó que existe mayor captación de pLL por LSEC de animales *Clec4f*^{-/-} en comparación con la captación por WT, tanto en términos de porcentajes de células positivas como de MFI.

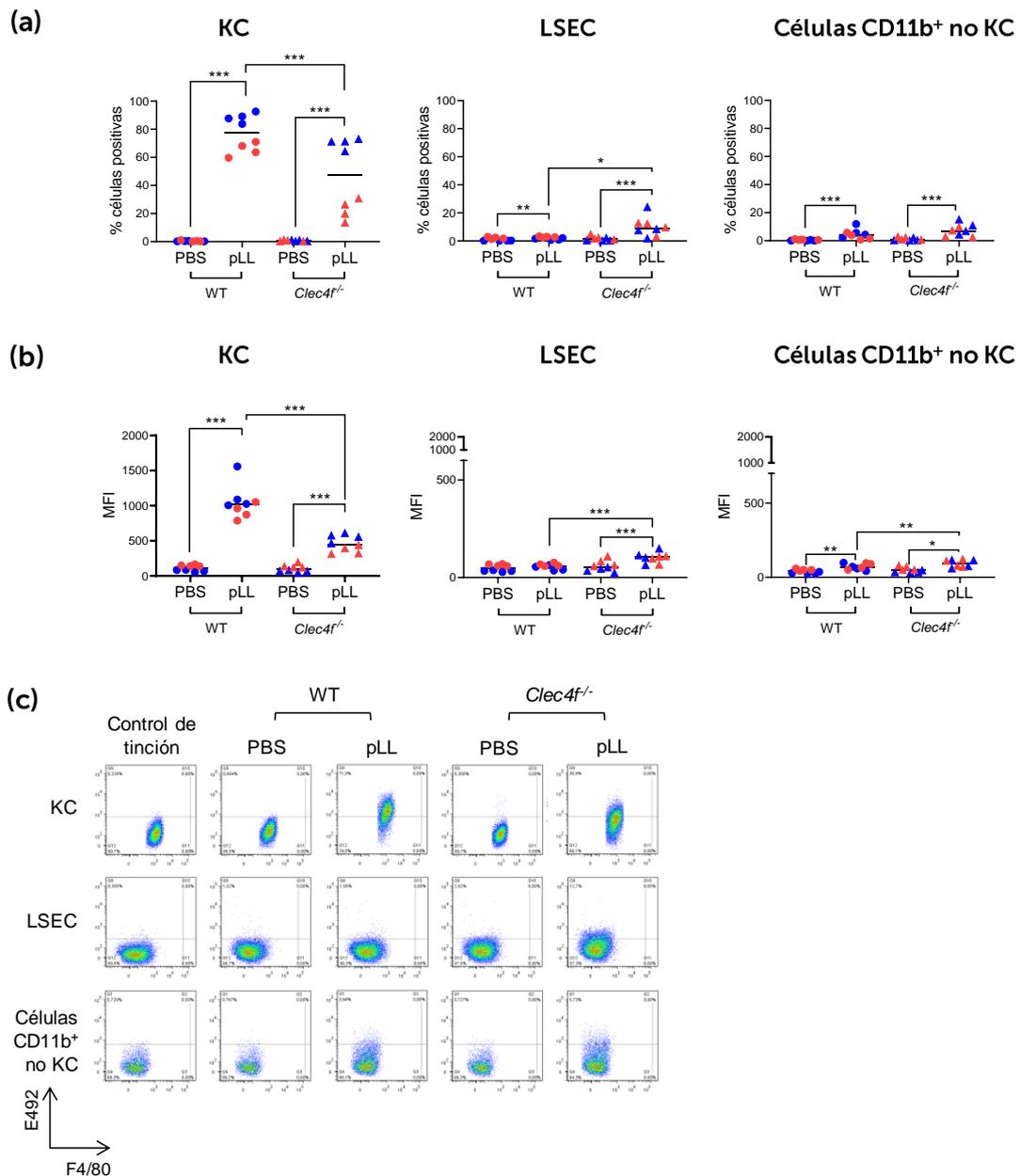


Figura 4.21. La internalización de pLL por KC depende en gran medida de Clec4F (II). Se inyectaron ratones C57BL/6 WT y *Clec4f*^{-/-} con pLL, o PBS como control de vehículo y se analizó la incorporación de material como se describió en la Figura 4.18, salvo que en este caso se empleó el anticuerpo E492 como sonda para detectar LL en lugar de PNA. Se muestran los resultados en términos de porcentaje de células positivas (a) y *MFI* (b), y los *dot plots* representativos para KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC (c). El umbral de fluorescencia se determinó empleando controles de tinción. Se muestran valores de ratones individuales de dos experimentos independientes, representados en dos colores distintos, y las medianas de los dos experimentos en conjunto. Se empleó el test estadístico de Mack-Skillings con post-test de Conover y corrección de Benjamini y Hochberg para comparaciones múltiples.

La comparación de la distribución de pLL entre los tipos celulares de la FNPH que captaron materiales de la LL por tinción con E492 (Figura 4.22) confirmó los resultados obtenidos por tinción con PNA, corroborando que en ambos genotipos las KC son el tipo celular más relevante en la captación de pLL. Además, se observó nuevamente que en los animales *Clec4f*^{-/-} tanto las LSEC como las células CD11b⁺ no KC contribuyen a dicha captación, si bien en forma subsidiaria en relación a las KCs.

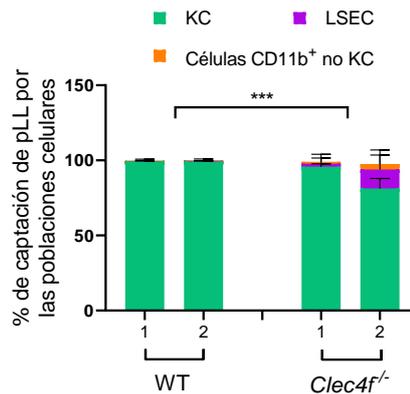


Figura 4.22. Las KC son el tipo celular principal de la FNPH en captar pLL (II). Se estimó la contribución de los tipos celulares presentes en la FNPH a la captación de pLL luego de 22 horas de inyección, tras la tinción de pLL con E492. Se grafica la contribución por KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC en términos de las medianas generales con su desvío estándar, de dos experimentos, 1 y 2, que se corresponden a los experimentos mostrados en la Figura 4.21 como azul y rojo, respectivamente. Se utilizó el test estadístico de Mack-Skillings para comparar la fracción de pLL captada por KC en los animales WT y *Clec4f*^{-/-}.

Se analizó la biodistribución de los materiales de la LL tras la inyección de pLL, en animales WT y *Clec4f*^{-/-}, por inmunohistoquímica sobre células de la cavidad peritoneal, o cortes de hígado, bazo, ganglio mesentérico, riñón, intestino y pulmón, utilizando como sonda para LL el anticuerpo E492 biotinilado. En primer lugar, y como era de esperarse, se observó una señal muy intensa en el sitio de inoculación de pLL, es decir la cavidad peritoneal, no pudiéndose distinguir diferencias entre los genotipos (Figura 4.23 y Tabla 4.1). En segundo lugar, los resultados confirmaron que la captación por KCs es mayoritariamente dependiente por Clec4F, ya que se observó una fuerte tinción en células que aparentaban ser KCs en animales WT, mientras que se detectó una débil señal en dichas células en animales *Clec4f*^{-/-}. En tercer lugar, e interesantemente, se observó además una débil captación de material en hepatocitos, tipo celular que no fue analizado por citometría de flujo, en animales de los dos genotipos, no discriminándose

una diferencia en la intensidad de la señal entre los mismos. Dado que los hepatocitos carecen de la capacidad de fagocitar elementos particulados¹⁴⁵, esta observación podría sugerir que las partículas de LL inyectadas liberarían partículas más pequeñas y/o mucinas solubles *in vivo*, que circularían de forma sistémica. En cuarto lugar, en los animales *Clec4f^{-/-}* se observó señal en ganglio mesentérico y bazo, que no se detectó (ganglio) o fue más débil (bazo) en los animales WT. Con respecto a la tinción en bazo, como se muestra en la Figura 4.24, en ambos genotipos se detectó señal de la LL tanto en la pulpa roja como en la pulpa blanca, siendo la señal en ambas localizaciones mayor en animales *Clec4f^{-/-}* que en animales WT. No se detectó señal en riñón, intestino y pulmón de animales WT ni *Clec4f^{-/-}* (imágenes no mostradas). Así, estos datos sugieren que la distribución en el organismo de los materiales de la LL inyectados difiere entre los genotipos: en los animales WT, los materiales se detectan principalmente en hígado (y preferentemente en las KC), mientras que, en los animales *Clec4f^{-/-}* los materiales parecen ser re-dirigidos al bazo y ganglios linfoides junto con captación por hepatocitos (también presente en animales WT).

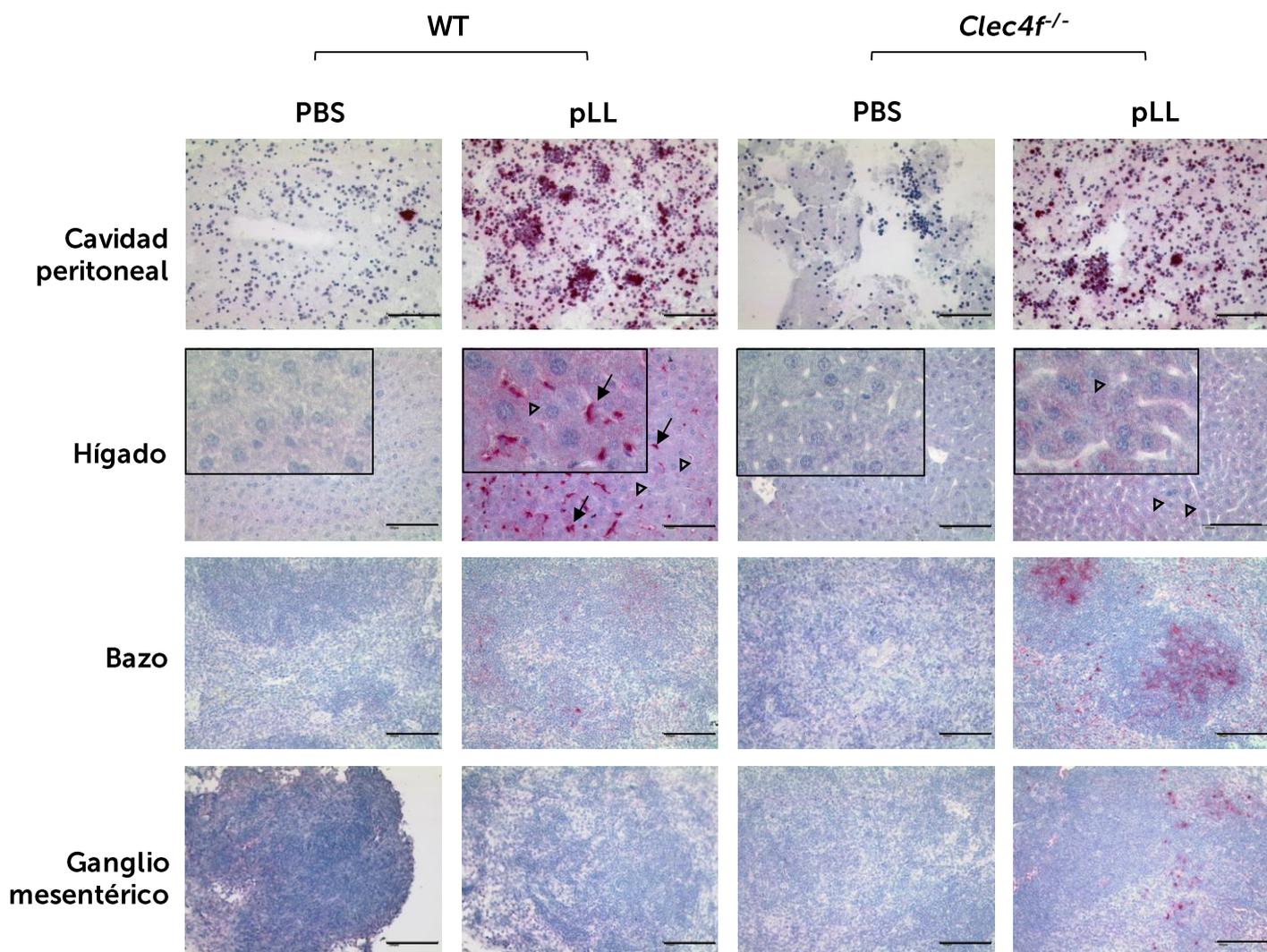


Figura 4.23. Los materiales particulados de la LL inyectados vía i.p. alcanzan la circulación y se distribuyen entre el hígado y órganos linfoides secundarios dependiendo de la presencia de **Clec4F**. Se estudió la presencia de pLL por inmunohistoquímica en células de la cavidad peritoneal, y cortes de hígado, bazo, ganglio mesentérico, pulmón, riñón e intestino, empleando el anticuerpo E492 como sonda para LL. Se muestran imágenes de un ratón (el mismo para el conjunto de imágenes) para cada condición experimental, representativas de tres ratones inyectados con pLL y dos inyectados con PBS para cada genotipo; las barras representan 100 μ m. Las flechas negras indican células que se asemejan a las KC y que se tiñeron fuertemente con E492, mientras que las cabezas de flecha señalan hepatocitos teñidos débilmente con E492. Se puede apreciar que en los animales WT inyectados con pLL la marca de LL se concentró en el hígado en células que se asemejan a las KC, detectándose además señales débiles en hepatocitos y en bazo, mientras que en los animales *Clec4f*^{-/-}, la marca se concentró en bazo y ganglio mesentérico acompañada de una señal débil en los hepatocitos. Análisis histológico realizado por Juliane Nell del grupo de investigación colaborador liderado por el Dr. Thomas Barth, de la Universidad de Ulm, Alemania, a partir de materiales generados por la tesista.

Órgano		WT		<i>Clec4f</i> ^{-/-}	
		PBS	pLL	PBS	pLL
Cavidad peritoneal		N/D	++++	N/D	++++
Hígado	KC	N/D	+++	N/D	+
	hepatocitos	N/D	+	N/D	+
Bazo		N/D	+	N/D	++
Ganglio mesentérico		N/D	N/D	N/D	++
Pulmón		N/D	N/D	N/D	N/D
Intestino delgado		N/D	N/D	N/D	N/D
Riñón		N/D	N/D	N/D	N/D

Tabla 4.1. Los materiales particulados de la LL inyectados vía i.p. alcanzan la circulación y se distribuyen entre el hígado y órganos linfoides secundarios dependiendo de la presencia de **Clec4F**. Se muestra una estimación semicualitativa (+, ++, +++, +++) de la intensidad de señal de los materiales de la LL detectados en los distintos tejidos analizados en el experimento detallado en la Figura 21. N/D: no se detectó señal de LL.

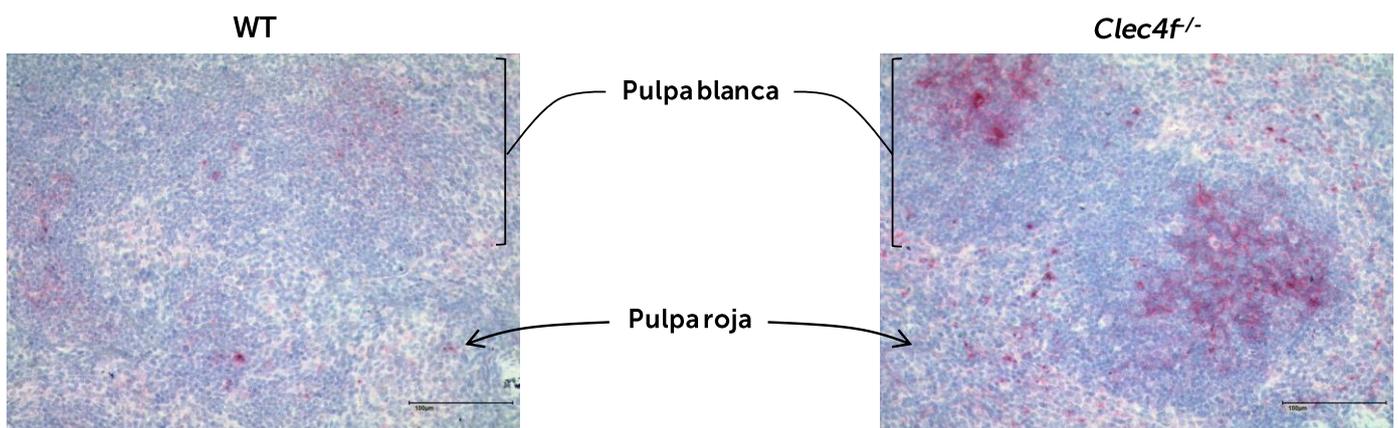


Figura 4.24. Luego de inyección i.p. de pLL se detectan materiales de la LL en bazo; y esta localización depende de la presencia de **Clec4F**. Se indican sobre las imágenes de inmunohistoquímica de bazo de un animal WT o *Clec4f*^{-/-} inyectados con pLL, mostradas en la Figura 4.23, las principales zonas de este órgano, es decir, la pulpa blanca y la pulpa roja.

Por microscopía confocal empleando dos canales de fluorescencia, se confirmó que las principales células que captan el material en animales WT son KCs, utilizando F4/80 como marcador de KC y E492 para detectar pLL (Figura 4.25).

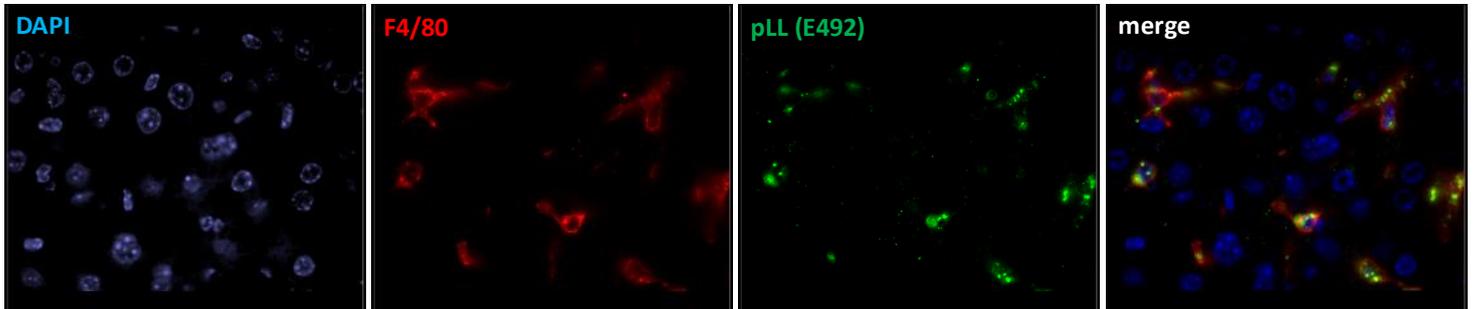


Figura 4.25. La mayor parte de la marca de la LL presente en el hígado de ratones WT luego de la inyección de pLL co-localiza con las KC. Se confirmó la localización de los materiales de la LL en las KC por histología de fluorescencia en cortes de hígado, empleando el anticuerpo E492 como sonda para LL y F4/80 como marcador de KC (aumento original x630). Análisis histológico realizado por Linyun Zhang del grupo de investigación colaborador liderado por el Dr. Thomas Barth de la Universidad de Ulm, Alemania, a partir de materiales generados por la tesista.

También se estudió la expresión de Clec4F en la superficie de las KCs tras la inyección de pLL (Figura 4.26), no observándose cambios en la misma, de forma análoga a lo observado tras la inyección de sLL.

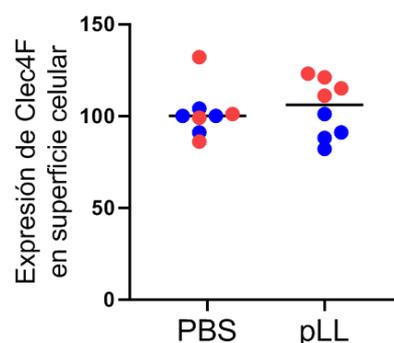


Figura 4.26. La expresión en la superficie de Clec4F en las KC no cambia tras la inyección de pLL. Se inyectaron ratones WT C57BL/6 con pLL o vehículo solamente (PBS), como se describió en la Figura 4.18, y luego de 22 horas se analizó la expresión de Clec4F en superficie por citometría de flujo. Se muestran los datos en términos de *MFI* de ratones individuales de dos experimentos independientes (en colores diferentes), y las medianas para los dos experimentos en conjunto. Los datos se normalizaron sobre el valor de la mediana de los ratones inyectados con PBS en cada experimento.

Los datos mostrados hasta el momento corresponden a la inyección de preparaciones de la LL solubilizada o particulada sometidas a tratamiento con EDTA para eliminar al otro gran componente de la LL además de las mucinas, es decir los depósitos de mioinositol hexakisfosfato cálcico (InsP_6Ca)^{65,66}. Se inició el presente proyecto con un material carente de dichos depósitos en pos de trabajar con una preparación de composición más sencilla, lo cual facilitaría el estudio de la contribución de la interacción con Clec4F a la posible internalización celular de materiales de LL por las KCs. Sin embargo, se torna relevante estudiar la captación de una preparación de LL que sea lo más parecida a la nativa para evaluar lo que podría ocurrir en el contexto de la infección, tanto experimental como natural. Es por esto que se analizó, de forma preliminar, la captación de una preparación particulada de LL que además de las mucinas contenía los gránulos de InsP_6Ca (wpLL, del inglés *whole particulate laminated layer*). El InsP_6Ca interactúa con el componente C1q del complemento⁶⁹ y por lo tanto podría determinar la interacción de la LL con receptores fagocíticos presentes en los tipos celulares de interés. C1q podría ser reconocido directamente por receptores específicos, así como también, tras su unión al InsP_6Ca en la LL, dar lugar a una activación controlada de la vía clásica del sistema complemento⁶⁹, conduciendo a la generación de las opsoninas C3b/C4b, que a su vez podrán ser reconocidas por receptores celulares¹⁷³. Esto podría impactar en cómo los materiales de la LL son captados por las células de la FNPH, así como también por otros fagocitos del organismo (no evaluados en este experimento).

En pos de hacer más probable la detección de una posible contribución del InsP_6Ca a la captación por KC, aún en presencia de la interacción dominante LL-Clec4F, se decidió trabajar con una dosis menor a la inyectada previamente (250 μg /ratón en lugar de 450 μg /ratón). Entonces, se inyectó vía intraperitoneal a ratones C57BL/6 WT o *Clec4f*^{-/-} la masa correspondiente a 250 μg de mucinas de las preparaciones de pLL o wpLL, o PBS como control de vehículo, y a las 22 horas se analizó la señal de LL en las células de la FNPH por citometría de flujo empleando el anticuerpo E492. Como se muestra en la Figura 4.27, aún en presencia de InsP_6Ca , las KC captaron ambos materiales de LL principalmente de forma dependiente de Clec4F. En los animales WT, la captación de ambos materiales resultó ser muy similar entre sí, mientras que, si bien solamente a nivel de una ligera tendencia, las KC de los animales *Clec4f*^{-/-} parecieron captar un poco

mejor a wpLL que a pLL. Con respecto a la captación por los otros tipos celulares de la FNPH, se observó un nivel muy bajo de captación de ambos materiales por las LSECs tanto en WT como en *Clec4f^{-/-}*, sin detectarse diferencias entre los genotipos. Con respecto a las células CD11b⁺ no KC, de forma similar a lo observado previamente (Figuras 4.18 y 4.21), estas células captaron ambos materiales particulados de la LL, y en el caso de pLL, la captación resultó ser mayor en los animales *Clec4f^{-/-}* que en los WT. Interesantemente, en ratones WT la captación de wpLL tendió a ser mayor que la de pLL, lo que sugiere que la presencia de *InsP₆.Ca* podría estar contribuyendo a la internalización de estos materiales por las células CD11b⁺ no KC. Se podría esperar que este efecto fuera más claro en los ratones *Clec4f^{-/-}*, dada la mayor cantidad de materiales de la LL circulantes disponibles. Sin embargo, no es lo que se observa, por razones para las que no es fácil aventurar explicación. Empleando un cálculo análogo al utilizado en las Figuras 7, 9, 14 y 16, se estimó la contribución de las distintas células de la FNHP a la captación de los materiales de la LL. Como se observa en la Figura 4.28, las KCs continúan siendo el principal tipo celular en captar ambos materiales de la LL, aún en ausencia de *Clec4F*. Además, se evidencia que la presencia de *InsP₆.Ca* en la LL no parece alterar la distribución de los materiales en los distintos tipos celulares analizados.

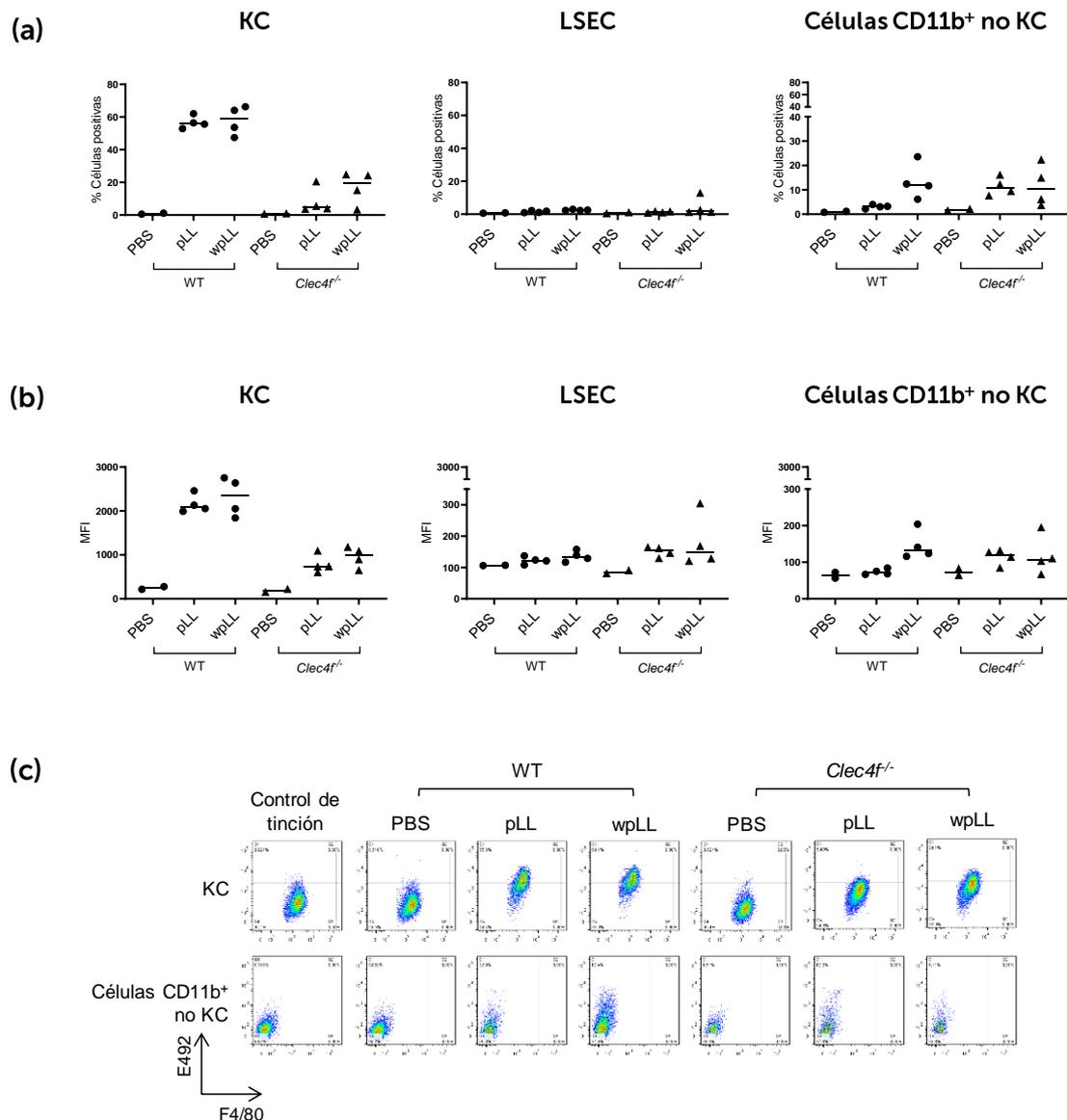


Figura 4.27. La presencia de $InsP_6$ cálcico en la LL no parece alterar la captación de materiales de la LL por KC dependiente de *Clec4F*. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT y *Clec4f*^{-/-} vía i.p. con pLL o wpLL (250 μ g de masa seca de mucinas en ambos casos), o PBS como control de vehículo. Luego de 22 horas, se sometieron a los animales a eutanasia y se cuantificó la captación de pLL por las células de la FNPH, luego de la permeabilización de las mismas, por citometría de flujo empleando E492 como sonda. Se muestran los resultados para KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC en términos de porcentaje de células (a) y de MFI (b), así como *dot plots* representativos para las KC y las células CD11b⁺ no KC (c). El umbral de fluorescencia se determinó empleando controles de tinción. Se muestran los datos de un único experimento con los valores de los ratones individuales y las medianas. No se realizó análisis estadístico de este experimento dado el bajo número de ratones grupo experimental.

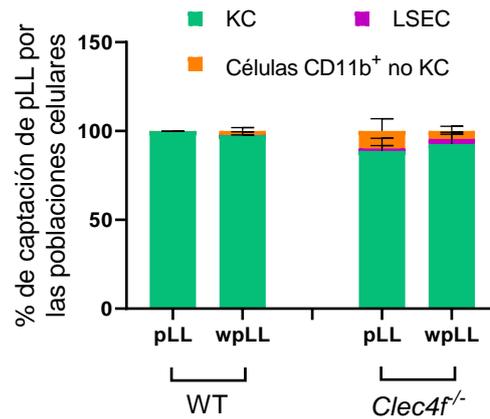


Figura 4.28. Las KC son el tipo celular principal de la FNPH en captar materiales de la LL con o sin *InsP₆* cálcico, en presencia o en ausencia de *Clec4F*. Se estimó la contribución de los tipos celulares presentes en la FNPH a la captación de pLL y de wpLL luego de 22 horas de inyección, tras la tinción de LL con E492. Se grafica la contribución de ambos materiales de LL por KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC en términos de las medianas generales con su desvío estándar del experimento mostrado en la Figura 4.27. No se realizó análisis estadístico de este experimento dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

En suma, los resultados mostrados en esta sección muestran que las mucinas de la LL exógenas, solubilizadas o particuladas, circulan por el organismo y llegan al hígado, donde son captadas selectivamente por las KC a través de *Clec4F* principalmente. Si bien la captación de mucinas de la LL es mayormente por las KC, otros tipos celulares del hígado, como son las LSEC, las células CD11b⁺ no KC y los hepatocitos, también pueden internalizar este material. Cabe mencionar que otros macrófagos, ubicados tanto en la cavidad peritoneal (si la inyección de materiales de la LL se da en esta ubicación) como en órganos linfoides secundarios, podrían contribuir a la captación de mucinas de la LL, pero la contribución de estos no fue evaluada en el presente trabajo.

4.2.5 Estudio preliminar de los posibles cambios en las células de la FNPH asociados con la internalización de materiales de la LL.

Como se mostró previamente, las células de la FNPH tienen la capacidad de captar materiales de la LL, tanto de naturaleza soluble (sLL) como particulada (pLL). Resultados previos del grupo han demostrado que la inyección intraperitoneal de pLL (no publicados), así como la infección experimental secundaria intraperitoneal en ratón, promueven la expresión de moléculas inhibitorias (PD-L1, PD-L2, IL-Ra) así como de

marcadores de polarización M(IL-4) (también conocidos como marcadores de activación alternativa; Relm- α , Ym-1, arginasa-1, CD206) en las distintas poblaciones de macrófagos presentes en la cavidad peritoneal⁸¹. Estos antecedentes llevaron al estudio, preliminar, de la expresión de algunos de los marcadores recién mencionados en las KC, así como en las LSEC, por citometría de flujo, tras la inyección de sLL y/o de pLL en animales WT y *Clec4f*^{-/-}. Fue de interés evaluar a las LSEC ya que las mismas, a pesar de no ser células inmunes, en ciertos aspectos responden como tales, pudiendo aumentar, en respuesta a estímulos para el sistema inmune innato, la expresión de moléculas inhibitorias y de marcadores M(IL-4)¹⁷⁴. No se estudió el fenotipo de las células definidas como CD11b⁺ no KC, ya que las mismas agrupan a varios tipos celulares (monocitos, otros macrófagos y neutrófilos). A continuación se comentan los resultados preliminares obtenidos tras la inyección de sLL en animales WT y *Clec4f*^{-/-}, y luego los resultados obtenidos tras la inyección de pLL en animales de ambos genotipos, en concordancia con el orden de los resultados mostrados previamente en relación a la captación de materiales de la LL.

Como se mostró en la Figura 4.14, 22 horas luego de la inyección de sLL, tanto las KCs como las LSEC internalizaron sLL. Se evaluó entonces si la captación de sLL por KC y LSEC se asociaba con la inducción del marcador de activación M(IL-4) (Ym-1 en este caso) y/o del inhibidor PD-L1. Como se puede apreciar en la Figura 4.29, la expresión de Ym-1 en KC mostró una tendencia al aumento tras la captación de sLL en animales WT, tanto en porcentaje de células positivas como en MFI. En LSEC se observó una tendencia a un aumento de la expresión del marcador tras la captación de sLL tanto en animales WT como en *Clec4f*^{-/-}.

En condiciones basales, tanto KC como LSEC expresan de forma constitutiva altos niveles de PD-L1^{129,132} (Thomson 2010, Horst 2016), los cuales no se vieron modificados tras la inyección de sLL (Figura 4.29). Con respecto a la inyección intraperitoneal de pLL, la cual aumenta la expresión de marcadores M(IL-4) en las poblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal, no se observó que la misma promoviera la expresión de CD206 ni de PD-L1 en KC ni en LSEC (Figura 4.30).

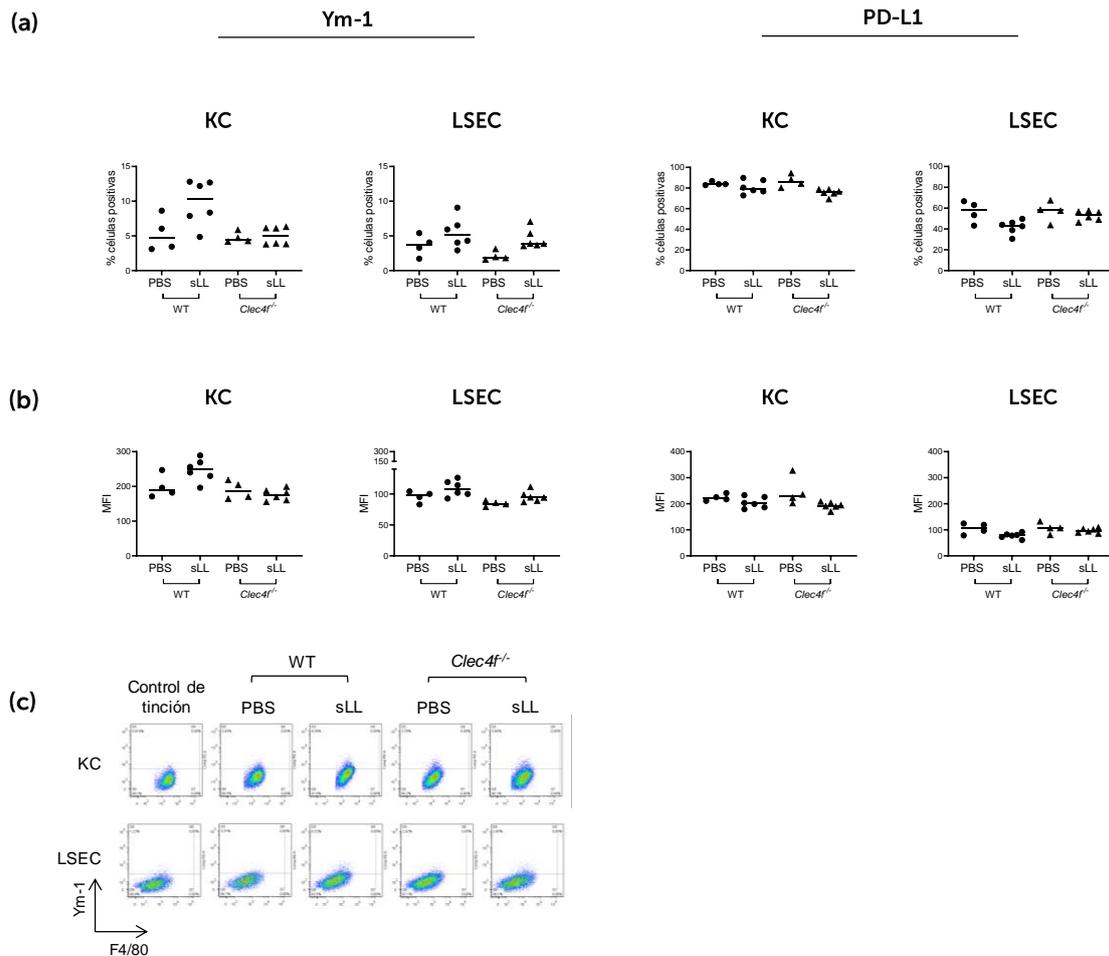


Figura 4.29. La inyección de sLL parece inducir la expresión del marcador M(IL-4) Ym-1 en KC y LSEC, mientras que no altera la expresión de PD-L1 en estos tipos celulares. Se inyectaron ratones WT y *Clec4f*^{-/-} vía i.v. con 200 µg de masa seca de sLL-BH₄ por ratón o PBS como control de vehículo. Luego de 22 horas se sometieron a los animales a eutanasia y analizó la expresión de Ym-1 (post-permeabilización celular) y la de PD-L1 en KC y LSEC por citometría de flujo. Se muestran los resultados en términos de porcentaje de células positivas (a) y de *MFI* (b) para cada marcador. El umbral de fluorescencia se estableció empleando un control de tinción en el cual solo se omitió el anticuerpo primario para cada caso. (c) Se muestran *dot plots* representativos para la señal de Ym-1 en KC y LSEC. Se grafican los datos de un único experimento (mostrado en color rojo en la Figura 4.14) con los valores de los ratones individuales y las medianas. No se realizó análisis estadístico de este experimento dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

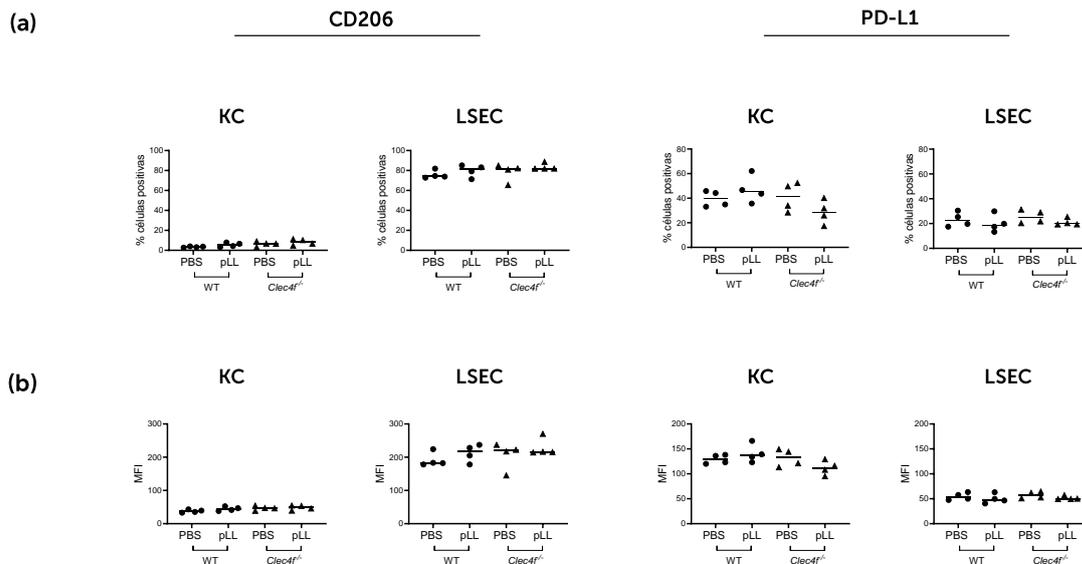


Figura 4.30. La inyección de pLL no modifica la expresión del marcador M(IL-4) CD206 ni de PD-L1 en KC ni LSEC. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT y *Clec4e*^{-/-} con pLL y se analizó la expresión en superficie celular de CD206 y PD-L1 en KC y LSEC. Se muestran los resultados en términos de porcentaje de células positivas (a) y *MFI* (b). El umbral de fluorescencia se determinó empleando controles de tinción. Los datos corresponden a un único experimento (mostrado en las Figuras 4.18 y 4.21 en color azul), con los valores de los ratones individuales y sus medianas. No se realizó análisis estadístico de este experimento dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

Datos previos del grupo han demostrado que la inyección de wpLL (preparación de LL que contiene los gránulos de *InsP₆.Ca*), potencia la expresión de PD-L1 en LPM con respecto a la inyección de pLL. Se evaluó entonces si wpLL podría potenciar la expresión de PD-L1 en KC. Tras la captación de wpLL por KC y LSEC (Figura 4.27), no se indujo cambios en la expresión de PD-L1 en ninguno de estos tipos celulares (Figura 4.31).

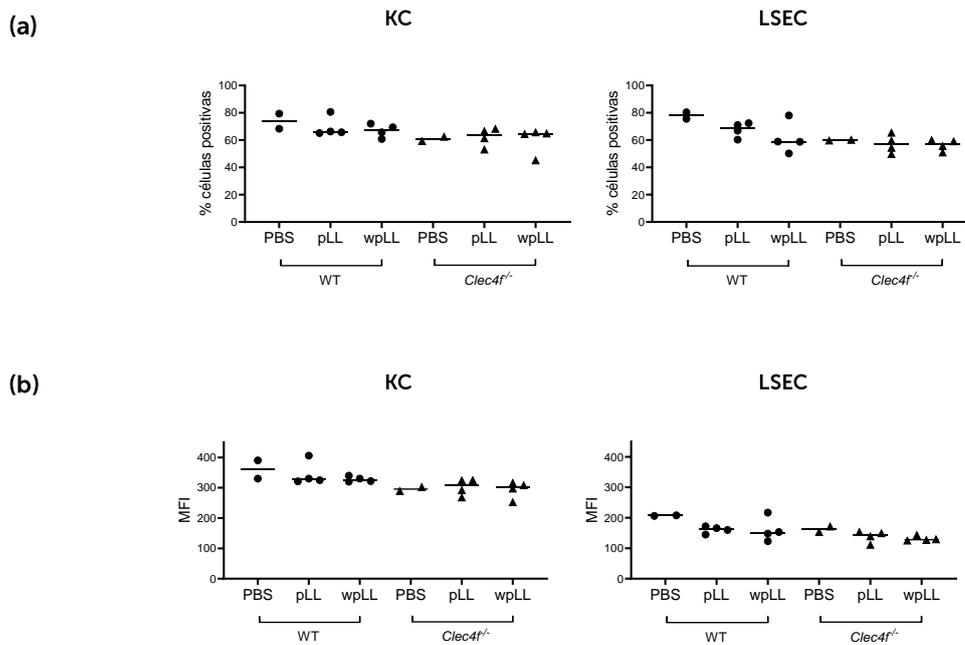


Figura 4.31. La inyección de pLL conteniendo $InsP_6$ cálcico (wpLL) no cambia la expresión de PD-L1 en KC ni en LSEC. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT y *Clec4f^{-/-}* vía i.p. con 250 μ g de masa seca de mucinas de pLL, de wpLL o PBS como control de vehículo. Luego de 22 horas, se sometieron a los animales a eutanasia y se estudió la expresión de PD-L1 en KC y LSEC por citometría de flujo. Se muestran los resultados en términos de porcentaje de células (a) y de MFI (b). El umbral de fluorescencia se determinó empleando controles de tinción. Se muestran los datos de un único experimento con los valores de los ratones individuales y las medianas. No se realizó análisis estadístico de este experimento dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

También se evaluó el número de las células de la FNPH tras la inyección de las distintas preparaciones de LL. Como se muestra en las Figuras 4.32-4.34, luego de la inyección de sLL, pLL y wpLL, respectivamente, no se generaron cambios en los números de las células de la FNPH, a excepción del aumento observado en el número de LSEC recuperadas en animales *Clec4f^{-/-}* inyectados con pLL. La misma tendencia se apreció cuando se inyectó una menor dosis de pLL (Figura 4.33) pero no cuando se inyectó wpLL.

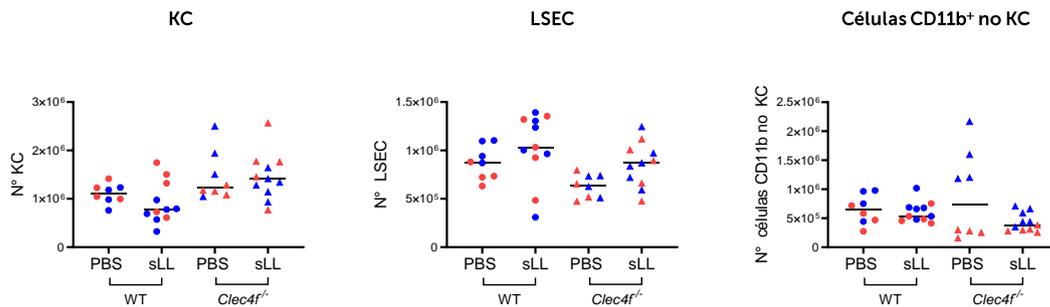


Figura 4.32. La inyección de sLL no cambia significativamente el número de células recuperadas de la FNP luego del procesamiento del órgano para citometría de flujo. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT y *Clec4f*^{-/-} con sLL o PBS como control de vehículo vía i.v.. Luego de 22 horas se sometieron los animales a eutanasia y se cuantificaron las células de la FNP recuperadas usando citometría de flujo y un contador automático de células (como se detalla en la sección Materiales y Métodos). Los datos mostrados corresponden a ratones individuales de dos experimentos independientes, representados en dos colores distintos (como en la Figura 4.14), y las medianas de los dos experimentos en conjunto. Se empleó el test estadístico de Mack-Skillings con post-test de Conover y corrección de Benjamini y Hochberg para comparaciones múltiples.

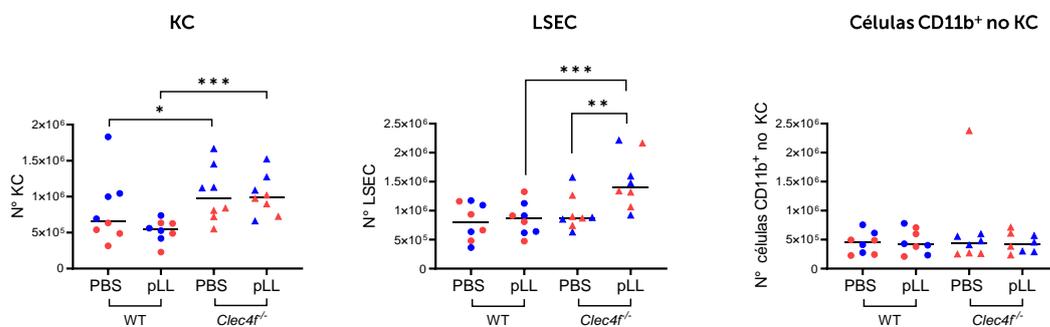


Figura 4.33. La inyección de pLL no cambia el número de células recuperadas de la FNP, a excepción de las LSEC en los ratones *Clec4f*^{-/-}. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT y *Clec4f*^{-/-} con pLL o PBS como control de vehículo vía i.v.. Luego de 22 horas se sometieron los animales a eutanasia y se cuantificaron las células de la FNP recuperadas usando citometría de flujo y un contador automático de células. Los datos mostrados corresponden a ratones individuales de dos experimentos independientes, representados en dos colores distintos (como en las Figuras 4.18 y 4.21), y las medianas de los dos experimentos en conjunto. Se empleó el test estadístico de Mack-Skillings con post-test de Conover y corrección de Benjamini y Hochberg para comparaciones múltiples.

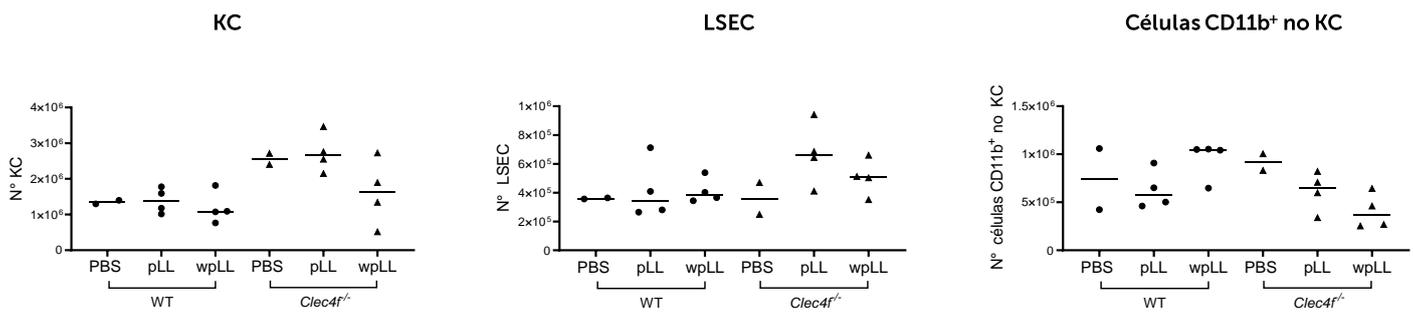


Figura 4.34. La inyección de wpLL no parece modificar los números de células recuperadas de la FNPH. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT y *Clec4f*^{-/-} vía i.p. con 250 µg de masa seca de mucinas de pLL de wpLL o PBS como control de vehículo. Luego de 22 horas se sometieron a los animales a eutanasia y se cuantificaron las células de la FNPH recuperadas usando contador de células y citometría de flujo. Los datos mostrados corresponden a un único experimento (Figura 4.27), con los valores de los ratones individuales y sus medianas. No se realizó análisis estadístico de este experimento dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

En forma independiente a la inyección de materiales de la LL, a lo largo de los distintos experimentos, se observó una tendencia a una mayor recuperación de KC en animales *Clec4f*^{-/-} que en animales WT, lográndose observar una diferencia significativa entre ambos genotipos tras la inyección de pLL. Esta discordancia en el número de KC entre animales WT y *Clec4f*^{-/-} no se debió a diferencias en el número de KC entre los genotipos, sino a una recuperación diferencial de estas células desde el tejido. De acuerdo con esto Jiang *et al.* 2021¹²⁴ reportaron que los números de KC en WT y *Clec4f*^{-/-}, determinados por histología, son similares. El estudio de estas diferencias ha sido abordado en la Tesis de Doctorado de Camila Mouhape (Laboratorio de Inmunología, Tesis en curso). Brevemente, los resultados sugieren que tal vez Clec4F podría participar en la adhesión celular de las KC al endotelio vascular, por lo que su ausencia facilitaría la extracción de KC del tejido, y por lo tanto aumentaría su número en la FNPH.

En suma, la captación de materiales de la LL, solubles o particulados con o sin InsP₆.Ca, por parte de KC y LSEC, no modificó, al menos a las dosis empleadas de materiales y al tiempo de estudio, la expresión de PD-L1 ni de los marcadores de activación alternativa evaluados (salvo por la tendencia a un aumento de la expresión de YM-1 en KC y LSEC tras la inyección de sLL).

4.3 Capítulo 3:

Estudio del papel de Clec4F en la captación de materiales de la LL y en la respuesta inmune durante la equinocosis quística experimental.

4.3.1 Estudio de la biodistribución y captación por las células del hígado de materiales de la LL liberados en el contexto de equinocosis quística secundaria experimental intraperitoneal.

Como se mencionó previamente, en infecciones en humanos por *E. granulosus* se ha reportado la presencia de partículas de la LL tanto en el sitio donde se aloja el parásito como en los ganglios drenantes⁹¹. A su vez, como se mostró en el segundo capítulo de Resultados de la presente Tesis, en el modelo de ratón, materiales de la LL exógenos son captados por las KC en forma mayoritariamente dependiente de Clec4F. Por lo anterior se buscó determinar si Clec4F también era relevante en la captación de materiales de la LL en el modelo de infección secundaria experimental (en ratón). Este modelo de infección crónica implica la inyección intraperitoneal del estadio parasitario protoscólex (PSC), el cual en el hospedero definitivo se desarrolla a la forma adulta, pero también es capaz de desarrollarse a hidátide en tejidos del hospedero intermediario. Este fenómeno se denomina equinocosis secundaria, y puede ocurrir en infecciones naturales, además de ser aprovechado experimentalmente. En el modelo empleado en esta Tesis, las hidátides se desarrollan en la cavidad peritoneal, libres o dentro de una cápsula de colágeno⁸³, volviéndose macroscópicamente detectables a los 5 meses o más (datos no publicados del grupo)

La posible internalización de materiales de la LL por KC en el contexto del modelo de infección experimental implicaría que dichos materiales deberían llegar a la circulación sistémica, de lo cual hasta el momento no existían evidencias, en este modelo, ni en infecciones naturales. Para evaluar si efectivamente las KC, a través de Clec4F, podían internalizar materiales de la LL en el contexto de la infección experimental, se infectaron ratones de la cepa Balb/c o ratones de la cepa C57BL/6 WT o *Clec4f*^{-/-}, por vía intraperitoneal, con 2500 PSC de *E. granulosus s.l.*; además se inyectaron ratones con PBS como control de vehículo. Luego de 7 o 9 meses de infección, se sometió a los animales a eutanasia y se analizó la señal de LL en la FNPH por citometría de flujo, así

como en distintos tejidos (cavidad peritoneal, hígado, bazo, ganglio mesentérico, pulmón, riñón e intestino) por inmunohistoquímica, utilizando las sondas PNA y el anticuerpo E492, respectivamente, de forma análoga a lo explicado anteriormente en el Capítulo 2 de la sección Resultados.

La cepa Balb/c es más susceptible a la infección que la cepa C57BL/6^{175,176}, lográndose entonces obtener mayores niveles de carga parasitaria en la primera que en la segunda cepa, así como mayor éxito en términos de lotes de infecciones exitosas. Con respecto a esto último, cabe destacar que de los 15 lotes de infecciones con *E. granulosus s. l.* realizadas durante esta Tesis en animales C57BL/6 WT y *Clec4f^{-/-}*, solamente 3 (todas confirmadas como de *E. granulosus s.s. G1*) resultaron exitosas.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos de una infección realizada en Balb/c y de dos infecciones en C57BL/6 (WT y *Clec4f^{-/-}*) analizadas luego de 7 meses (7 meses p.i.), y los datos de una infección en C57BL/6 (WT y *Clec4f^{-/-}*) analizada luego de 9 meses (9 meses p.i.).

Como se puede apreciar en la Figura 4.35, efectivamente se obtuvieron mayores niveles de carga parasitaria en los animales de la cepa Balb/c que en los C57BL/6, luego de 7 meses de infección. Los ratones Balb/c tuvieron una mediana en la carga parasitaria de 25 mL, lo cual constituye una carga parasitaria extremadamente elevada, mientras que los ratones WT C57BL/6 tuvieron una mediana de 1,5 mL. Dentro de la cepa C57BL/6, se obtuvieron lotes de infección con cargas parasitarias muy diferentes entre sí, a pesar de ser infectadas con la misma carga de PSC de *E. granulosus s.s. (G1)* (2500) y de tener el mismo tiempo de infección (7 meses). En los gráficos mostrados a lo largo de este capítulo relacionados a estos experimentos, el experimento de alta carga parasitaria se representa siempre con puntos azules y el experimento de baja carga parasitaria con puntos rojos.

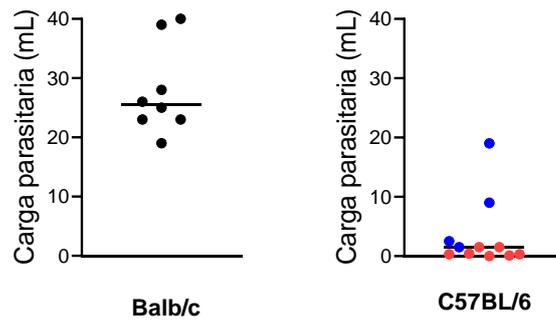
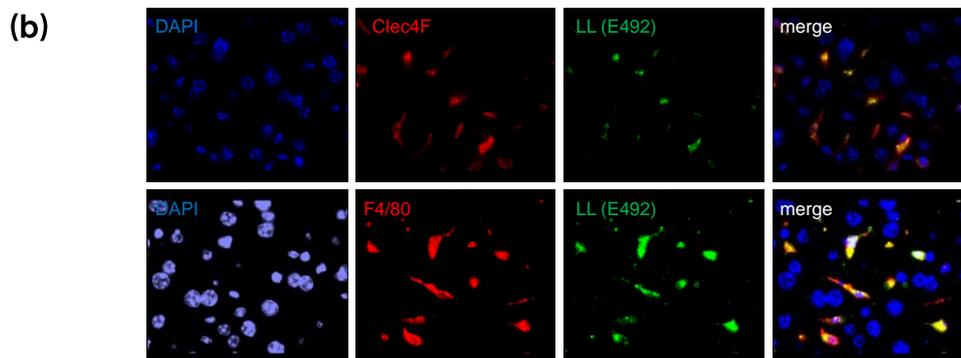
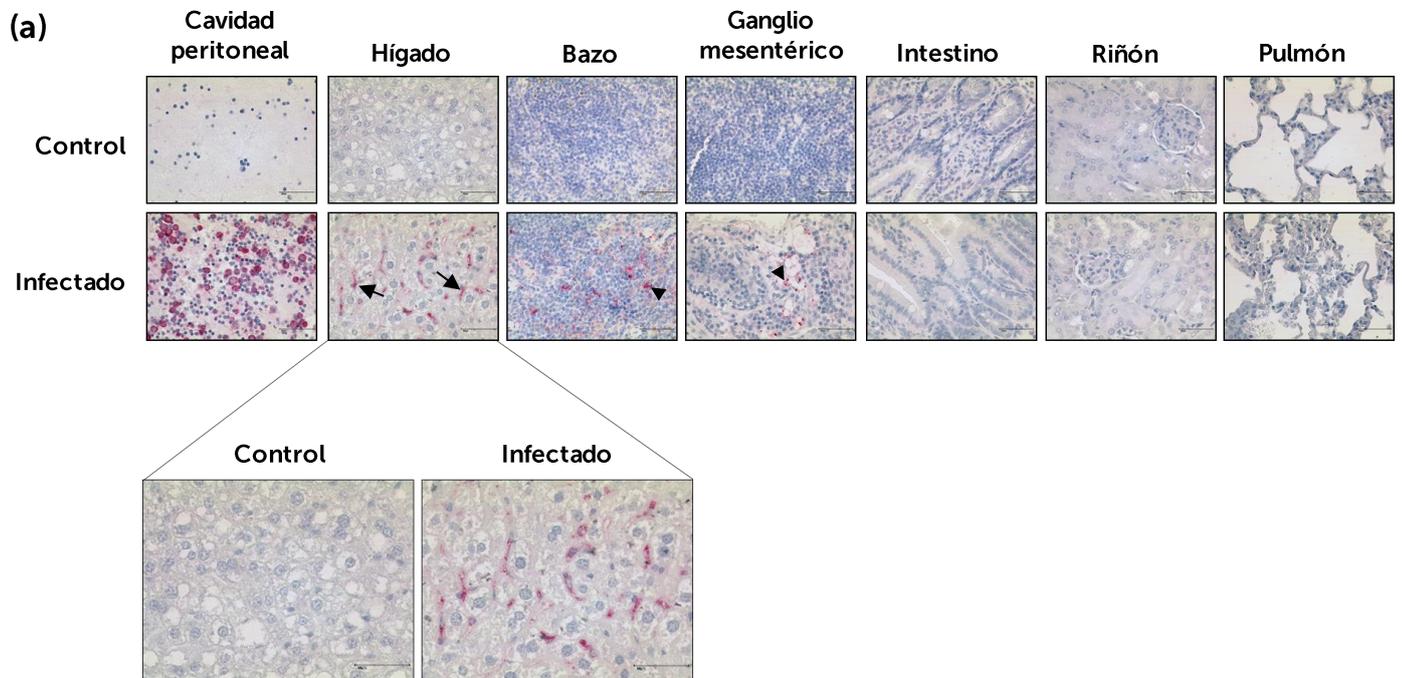


Figura 4.35. Cargas parasitarias de ratones de tipo silvestre infectados con *E. granulosus s.s.* Se infectaron ratones Balb/c o C57BL/6 WT con 2500 PSC de *E. granulosus s.s* vía i.p.. Luego de 7 meses, se sometió a los animales a eutanasia. La carga parasitaria se expresó como el volumen total de metacestodos por individuo, medida por desplazamiento de volumen de agua. Los resultados de la infección en Balb/c corresponden a un único experimento, mientras que los de C57BL/6 corresponden a dos experimentos independientes, marcados con colores distintos. Se muestran los datos de los ratones individuales y la mediana de los valores, del experimento o de los dos experimentos en conjunto. Los animales Balb/c infectados fueron provistos por el Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin.

La diferencia en las cargas parasitarias observadas en las distintas cepas, y por lo tanto de la cantidad de materiales de la LL circulantes, pudo condicionar la detección por inmunohistoquímica de dichos materiales en los distintos tejidos de los animales infectados. De hecho, se pudo obtener datos sobre la biodistribución de los materiales de la LL en Balb/c, y no así en C57BL/6. Empleando como sonda al anticuerpo E492, en todos los ratones Balb/c infectados se detectó señal en el sitio de infección (cavidad peritoneal) y en el hígado, así como también en el bazo y en ganglios mesentéricos, aunque en estos últimos en solo una fracción de los animales (13/16 y 7/12, respectivamente) (Figura 4.36a). No se detectaron materiales de la LL en riñón, pulmón ni intestino. Estos resultados mostraron que, en animales infectados, las mucinas de la LL circulan sistémicamente y son concentradas en el hígado. Dentro del hígado, la señal se concentró en células que se asemejaban a las KC (Figura 4.36a). La identidad de estas células fue confirmada por microscopía confocal empleando dos marcas, F4/80 o Clec4F (para definir KC) y E492 (para LL) (Figura 4.36b). De forma similar a lo observado tras la inyección de pLL en ratones C57BL/6 (Figura 4.23), en el contexto de la infección experimental en ratones Balb/c se detectó señal de materiales de la LL en un animal

infectado con alta carga parasitaria (21 ml), en hepatocitos (determinado mediante tinción con PNA) (Figura 4.37).



Ver leyenda de Figura 4.36 en la siguiente página.

Figura 4.36. Los materiales de la LL circulan sistémicamente durante la infección por *E. granulosus s.s* en ratones y son concentrados en el hígado, donde co-localizan con las KC. Se infectaron ratones Balb/c con 2500 PSC de *E. granulosus s.s* vía i.p., o se inyectaron con PBS como control. Luego de 7 meses se sometió a los animales a eutanasia y se estudió la presencia de materiales de la LL en varios órganos por inmunohistoquímica, usando el anticuerpo E492 como sonda. (a) Se muestran imágenes de un ratón infectado y un ratón control, representativas de 15 ratones infectados y 5 controles; las barras representan 50 μm . Las flechas negras indican células similares a KC que se tiñeron con E492, y las cabezas de flecha indican tinción para materiales de la LL observada en bazo y ganglio mesentérico. No se detectó tinción en cortes ensayados con el reactivo secundario solamente. (b) La localización preferencial de los materiales de la LL en las KC de animales infectados se confirmó por inmunohistoquímica de fluorescencia, empleando E492 como sonda para LL, y F4/80 o Clec4F como marcador de KC (aumento x630). Análisis histológico realizado por Linyun Zhang, del grupo de investigación colaborador liderado por el Dr. Thomas Barth de la Universidad de Ulm, Alemania, a partir de materiales generados por la tesista.

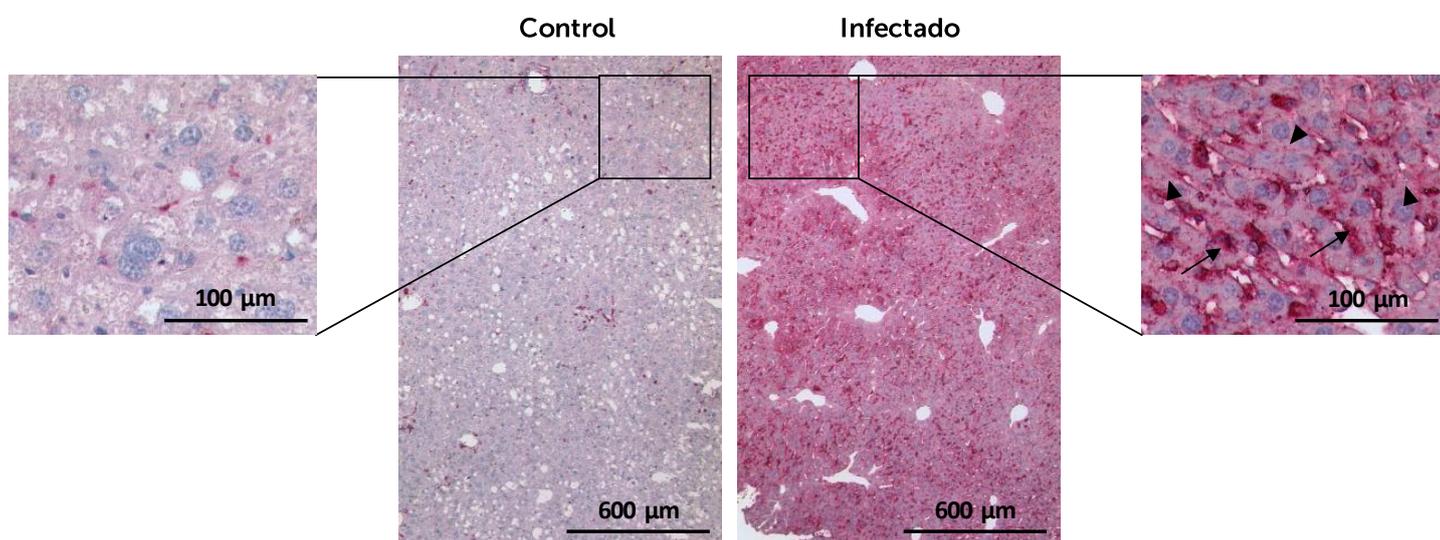


Figura 4.37. Los materiales de la LL liberados durante la infección por *E. granulosus s.s* en ratones son concentrados en el hígado y parecen localizarse en las KC y los hepatocitos. Se infectaron ratones Balb/c con 2500 PSC de *E. granulosus s.s* vía i.p., o se inyectaron con PBS como control. Luego de 7 meses se sometió los animales a eutanasia y se estudió la presencia de materiales de la LL en hígado por histoquímica, usando PNA como sonda. Se muestran imágenes de un ratón infectado y un ratón control, representativas de 15 ratones infectados y 5 controles. Las flechas negras indican células similares a KC que se tiñeron con PNA, y las cabezas de flecha indican tinción para materiales de la LL observada en hepatocitos. Análisis histológico realizado por Linyun Zhang, del grupo de investigación colaborador liderado por el Dr. Thomas Barth de la Universidad de Ulm, Alemania, a partir de materiales generados por la tesista.

La captación selectiva por KC dentro de las células de la FNPH de ratones Balb/c infectados fue confirmada por citometría de flujo (Figura 4.38). En este análisis no se detectó señal de materiales de la LL en LSEC, a diferencia de lo observado tras la inyección de sLL o pLL. Con respecto a las células CD11b⁺ no KC, a pesar de que no se detectaron diferencias significativas respecto a los animales no infectados, una fracción de estas células pareció captar materiales de la LL. Además, la frecuencia de las células CD11b⁺ no KC dentro de las células presentes en la FNPH aumentó significativamente durante la infección, lo que sugiere que, en este contexto, contrariamente a los contextos de inyección de materiales de LL, existiría reclutamiento de células inflamatorias (Figura 4.39).

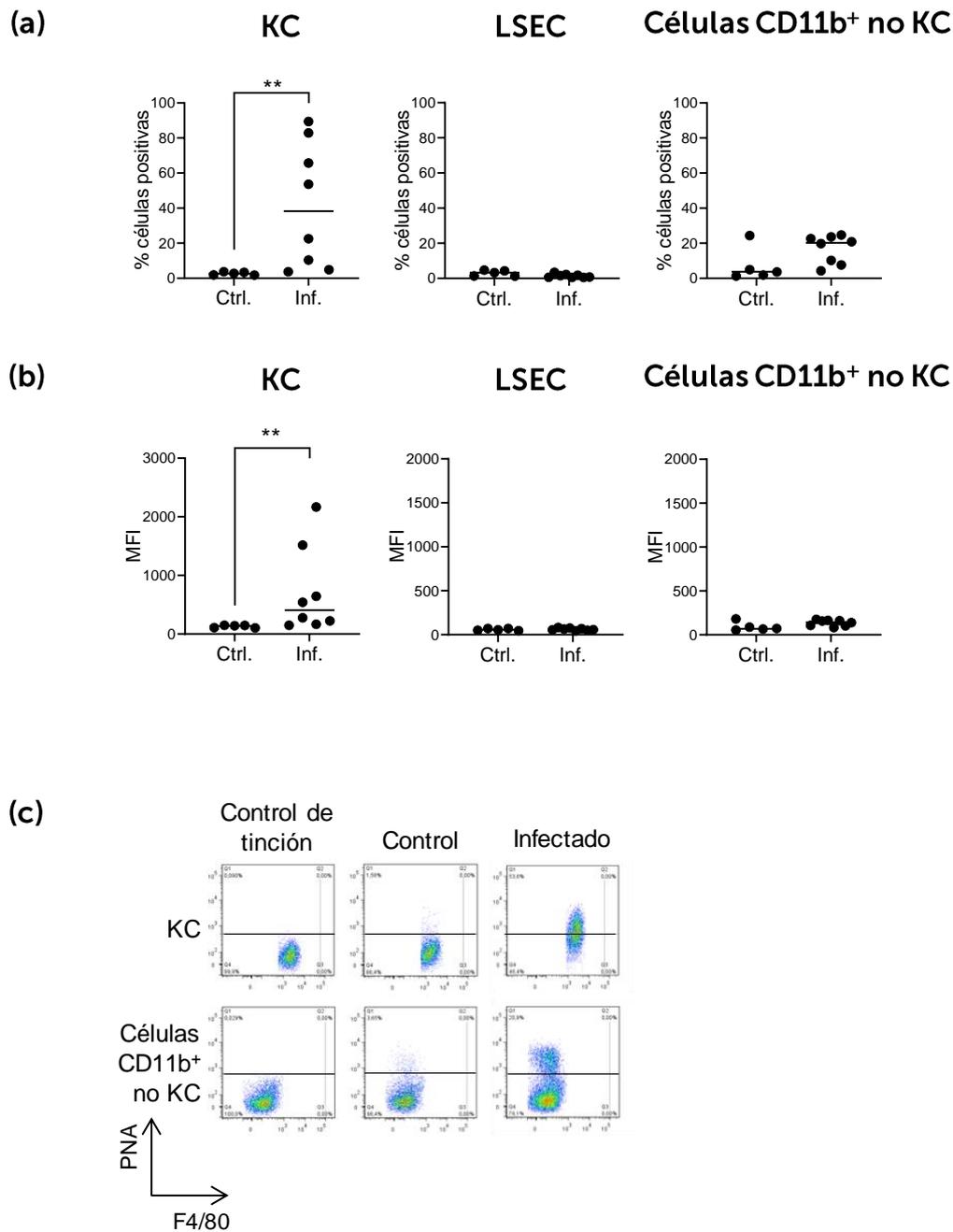


Figura 4.38. Durante la infección por *E. granulosus*, los materiales de la LL son captados por las KC. Se infectaron ratones Balb/c o se inyectaron con PBS como control, como se describió en las Figuras 4.35 y 4.36, y luego de 7 meses se les sometió a eutanasia. Se analizó por citometría de flujo la incorporación de materiales de la LL a las células de la FNPH permeabilizadas, empleando PNA como sonda. (a y b) Se muestran los datos de captación por las KC, las LSEC y las células CD11b⁺ no KC, en términos de porcentaje de células positivas (a) y de *MFI* (b). El umbral de fluorescencia se estableció empleando un control de tinción en el cual solo se omitió la PNA biotinilada. Se grafican valores de ratones individuales y de la mediana de los datos, correspondientes a un único experimento. (c) Se muestran *dot plots* representativos para la señal en KC y las células CD11b⁺ no KC. El análisis estadístico fue realizado mediante el método de Wilcoxon-Mann-Whitney modificado.

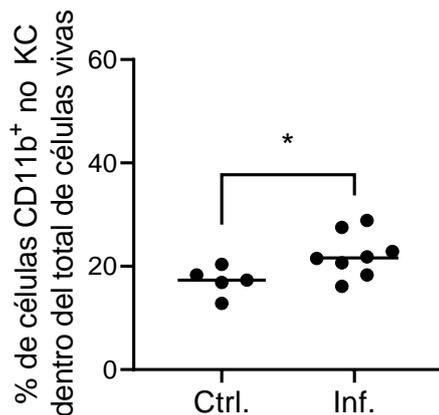


Figura 4.39. La infección por *E. granulosus* en ratones Balb/c aumenta la frecuencia de las células CD11b⁺ no KC dentro del total de las células de la FNP. Se infectaron ratones Balb/c o se inyectaron con PBS como control como se describió en las Figuras 4.35 y 4.36, y se determinó la frecuencia de las células CD11b⁺ no KC dentro de las células vivas de la FNP. Se muestran valores de ratones individuales y de la mediana de los datos correspondientes a un único experimento. El análisis estadístico fue realizado mediante el método de Wilcoxon-Mann-Whitney modificado.

Luego se analizó la captación de materiales de la LL en ratones C57BL/6 WT y *Clec4f*^{-/-} infectados. Como se comentó previamente, no se detectó señal de LL por inmunohistoquímica en estos animales, por lo que sólo se muestran a continuación los resultados del análisis por citometría de flujo.

Como se muestra en la Figura 4.40, se detectó la señal de materiales de la LL en KC de animales WT pero no en animales *Clec4f*^{-/-}. No se observó captación clara por LSEC ni por las células CD11b⁺ no KC; si bien se observó una ligera tendencia a captación por estas últimas, la misma no llegó a la significancia estadística. No se observó un aumento en la frecuencia de las células CD11b⁺ no KC, contrariamente a lo observado en los animales Balb/c infectados (Figura 4.41). No se observó correlación entre el nivel de captación de materiales de la LL por las KC y la carga parasitaria, en animales WT ni en los *Clec4f*^{-/-}.

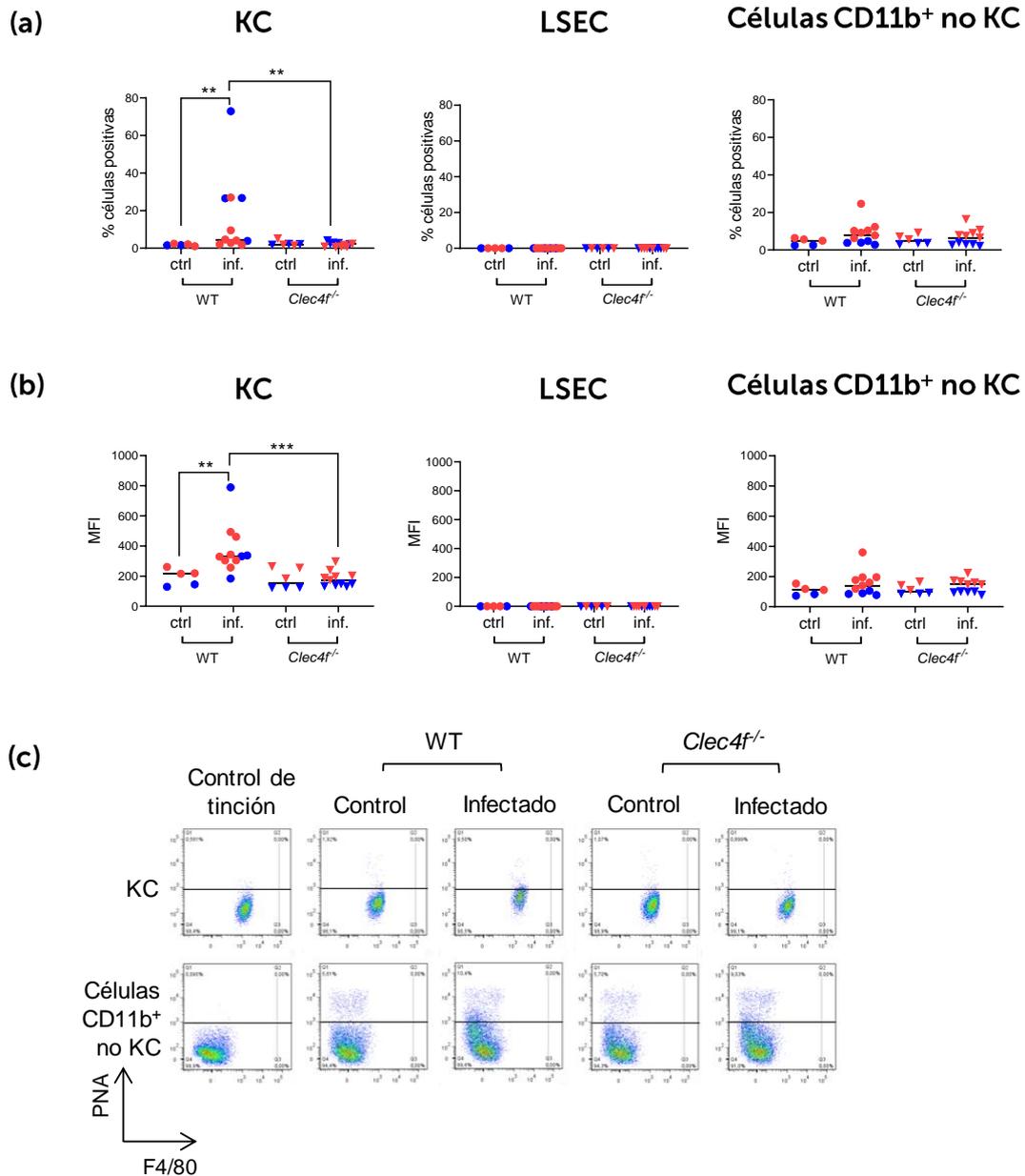


Figura 4.40. A los 7 meses p.i. por *E. granulosus* en ratones, los materiales de la LL son capturados por las KC, en forma mayoritariamente dependiente de *Clec4F*. Se infectaron ratones C57BL/6 WT o *Clec4f^{-/-}*, o se inyectaron con PBS como control, como se describió en la Figura 4,35. Luego de 7 meses, se sometió a los animales a eutanasia y se analizó la incorporación de materiales de la LL por las células de la FNPH permeabilizadas por citometría de flujo, empleando PNA como sonda. (a y b) Se muestran los datos de captación por las KC, las LSEC y las células CD11b⁺ no KC, en términos de porcentaje de células positivas (a) y de MFI (b). El umbral de fluorescencia se estableció empleando un control de tinción en el cual solo se omitió la PNA biotilada. Se grafican los datos de dos experimentos independientes (mostrados en colores distintos); se muestran valores de los ratones individuales y de las medianas globales de los dos experimentos. (c) Se muestran *dot plots* representativos para la señal en KC y las células CD11b⁺ no KC. El análisis estadístico fue realizado mediante el test de Kruskal-Wallis con post-test de Conover y corrección de Benjamini y Hochberg para comparaciones múltiples.

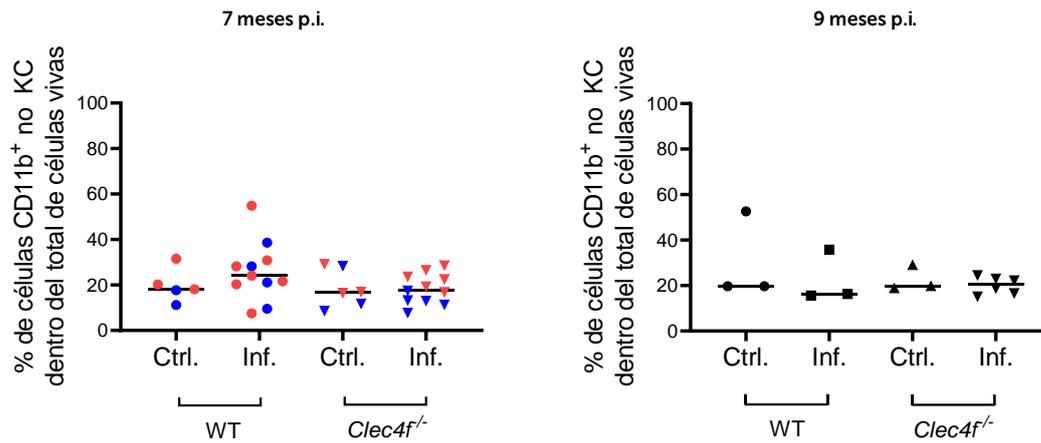


Figura 4.41. La infección por *E. granulosus* no aumenta la frecuencia de las células CD11b⁺ no KC dentro del total de las células de la FNP, en ratones C57BL/6 WT ni *Clec4f*^{-/-}. Se infectaron ratones C57BL/6 WT o *Clec4f*^{-/-} o se inyectaron con PBS como control como se describió en las Figuras 4.35 y 4.36, y se determinó la frecuencia de las células CD11b⁺ no KC dentro de las células vivas por citometría de flujo. Para los experimentos 7 meses p.i se grafican los datos de dos experimentos independientes (mostrados en colores distintos), mostrándose los valores de los ratones individuales y las medianas globales de los dos experimentos, mientras que se muestra los datos de un único experimento a los 9 meses p.i.. El análisis estadístico para los experimentos de 7 meses p.i. se realizó mediante el test Kruskal-Wallis. No se realizó análisis estadístico para el experimento de 9 meses p.i. dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

Adicionalmente se obtuvieron datos de un experimento de 9 meses de infección, en lugar de 7 meses. A este tiempo, a pesar de la gran dispersión que presentaron los datos, se pudo apreciar una mayor contribución de mecanismos independientes de *Clec4f* a la captación de mucinas de la LL, en comparación con lo observado a los 7 meses p.i. (Figura 4.42). En forma similar a lo observado a los 7 meses de infección, no se detectó señal de LL en LSEC ni en células CD11b⁺ no KC, ni aumento en la frecuencia de las células CD11b⁺ no KC (Figura 4.41).

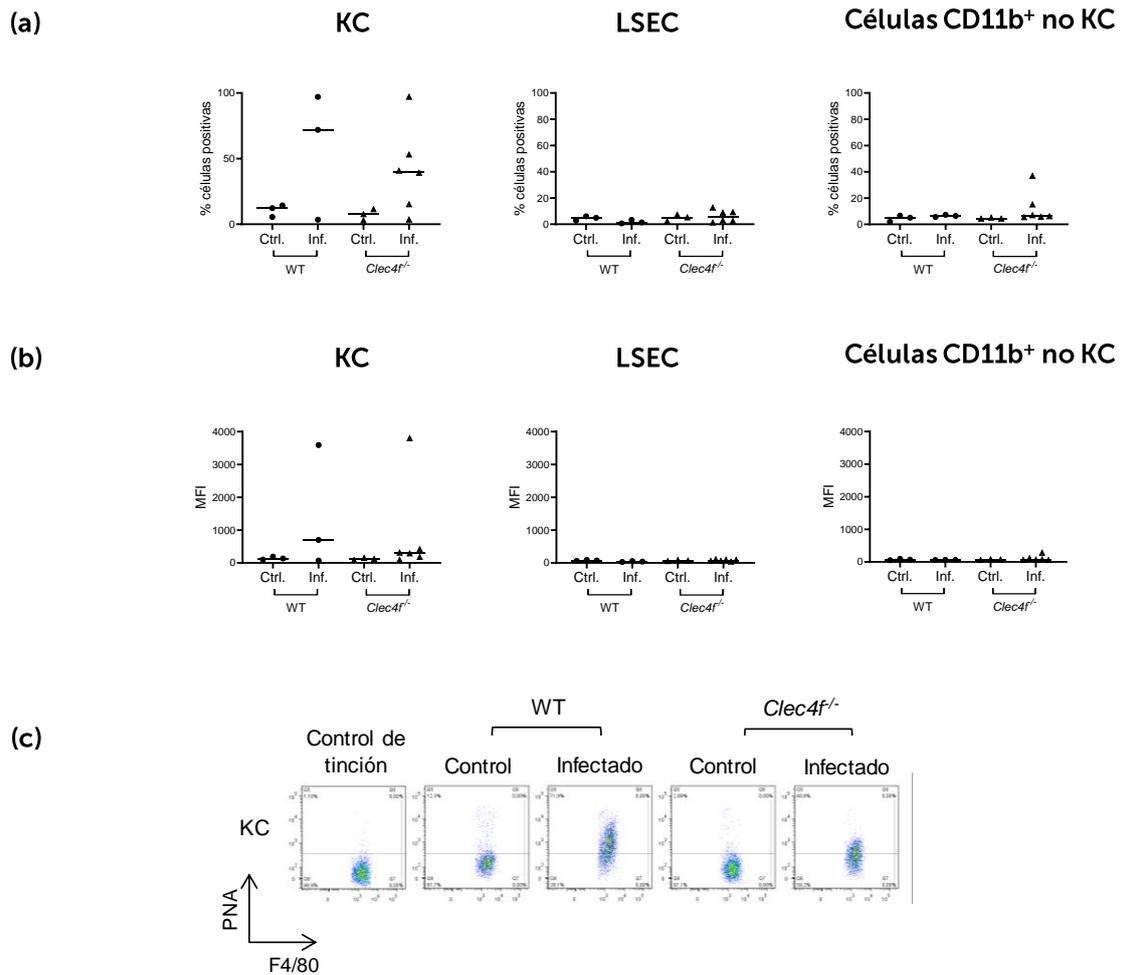


Figura 4.42. A los 9 meses p.i. por *E. granulosus* los materiales de la LL son captados por las KC. Se infectaron ratones C57BL/6 WT o *Clec4f^{-/-}*, o se inyectaron con PBS como control como se describió en la Figura 4.35. Luego de 9 meses, se sometió a los animales a eutanasia y se analizó la incorporación de materiales de la LL por las células de la FNPH permeabilizadas, por citometría de flujo, empleando PNA como sonda. (a y b) Se muestran los datos de captación por las KC, las LSEC y las células CD11b⁺ no KC, en términos de porcentaje de células positivas (a) y de MFI (b). El umbral de fluorescencia se estableció empleando un control de tinción en el cual solo se omitió la PNA biotinilada. Se grafican los valores de los ratones individuales y las medianas correspondientes a un único experimento. (c) Se muestran *dot plots* representativos para la señal en KC. No se realizó análisis estadístico dado el bajo número de individuos en cada grupo experimental.

De forma análoga a lo observado tras la inyección de sLL o pLL, la expresión de Clec4F en superficie de las KC no se vio modificada por la infección, ni en los animales Balb/c ni en los WT C57BL/6, tras 7 y 9 meses de infección (Figura 4.43).

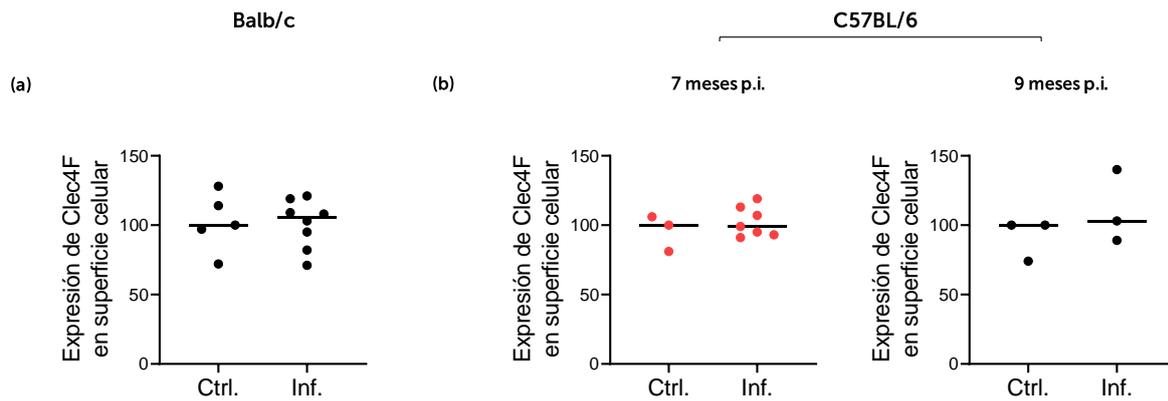


Figura 4.43. La expresión de Clec4F en la superficie de las KC no parece ser alterada por la infección por *E. granulosus*. Se infectaron ratones Balb/c o C57BL/6 WT con *E. granulosus* como se describe en la Figura 1. Se analizó la expresión de Clec4F en la superficie de las KC por citometría de flujo. Se muestran los datos de un único experimento para la infección en Balb/c (a) y para infecciones en C57BL/6 de 7 y 9 meses (b), en términos de MFI. Los datos se normalizaron sobre el valor de la mediana de los ratones inyectados con PBS (controles) en cada experimento. Para el experimento con Balb/c se realizó el análisis estadístico mediante el método modificado de Wilcoxon-Mann-Whitney. No se realizó análisis estadístico en el caso de las infecciones en C57BL/6 dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

En suma, en el contexto de la equinocosis quística experimental, las mucinas de la LL liberadas en el sitio de la infección (cavidad peritoneal) circulan de forma sistémica y llegan al hígado en donde son captadas por las KC en forma dependiente de Clec4F, principalmente.

4.3.2 Estudio preliminar del papel de Clec4F en la respuesta inmune en la equinocosis quística experimental.

Como se mencionó previamente, las KC pueden inducir la expansión de células T CD4⁺ reguladoras FoxP3⁺, ya que expresan MHC de clase II y realizan presentación antigénica extra-linfoide de tipo tolerogénica^{129,132}. Esto llevó a la pregunta de si la interacción LL-Clec4F podría condicionar a la respuesta inmune durante la equinocosis quística, en particular favoreciendo la sobrevivencia del parásito. Para evaluar esto se procedió a analizar y comparar la respuesta inmune en el modelo de infección crónica intraperitoneal en ratones WT y *Clec4f*^{-/-}.

Se describen a continuación resultados que corresponden a una caracterización preliminar, parcial, de la respuesta inmune en el modelo de infección crónica intraperitoneal. Se muestran los resultados de los dos experimentos de 7 meses p.i. (datos de captación de materiales de la LL en la Figura 4.40) y los datos correspondientes al experimento de 9 meses p.i. (datos de captación de materiales de la LL en la Figura 4.42).

A nivel del sitio de infección, se evaluó la carga parasitaria, así como la celularidad de la cavidad peritoneal, la expresión del marcador del fenotipo M(IL-4) Relm- α , y la expresión del co-inhibidor PD-L1, por parte de las poblaciones de monocitos/macrófagos. Para el análisis de las células, se recuperaron las mismas de la cavidad mediante lavados peritoneales y se analizaron por citometría de flujo. En la Figura 4.44 se muestra la estrategia de definición celular empleada para la caracterización de las poblaciones celulares que se analizaron, que fueron los eosinófilos y las principales poblaciones de monocitos/macrófagos. Dentro de estas últimas están los monocitos recientemente reclutados, los macrófagos pequeños de la cavidad peritoneal (del inglés, *small peritoneal macrophages*, SPM) y los macrófagos grandes de la cavidad peritoneal (del inglés, *large peritoneal macrophages*, LPM). No se estudió la dinámica de los linfocitos, de los neutrófilos, ni de otras poblaciones de células inmunes.

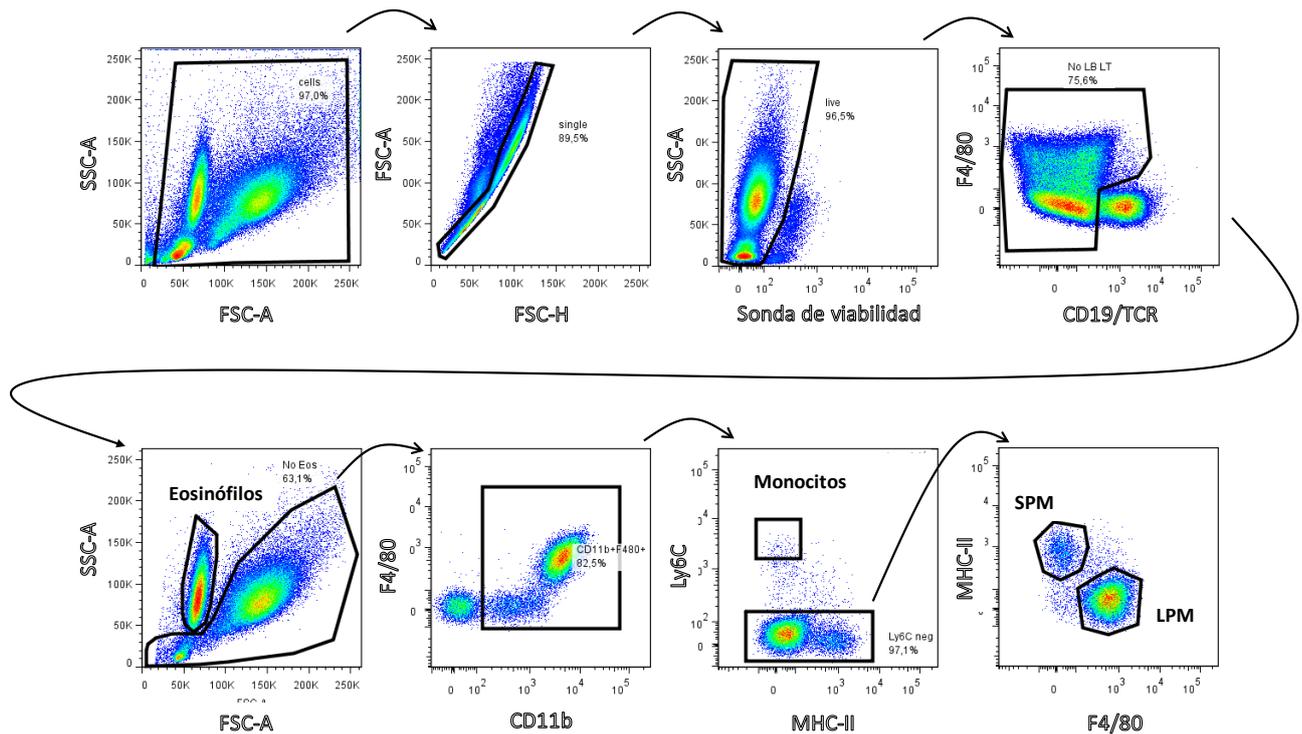


Figura 4.44. Estrategia de clasificación celular para las células de la cavidad peritoneal. Se muestra la estrategia de clasificación celular empleada para discriminar a los eosinófilos y a las distintas poblaciones de monocitos/macrófagos de la cavidad peritoneal. Dentro de estas últimas están los monocitos recientemente reclutados (definidos como $Ly6C^{alto}MHCII$), los macrófagos pequeños de la cavidad peritoneal (del inglés, *small peritoneal macrophages*, SPM) definidos como $Ly6C^{-}F4/80^{bajo}MHC-II^{+}$, y los macrófagos grandes de la cavidad peritoneal (del inglés, *large peritoneal macrophages*, LPM) definidos como $Ly6C^{-}F4/80^{alto}MHCII^{low}$. Referencias: SSC, *side scatter*; FSC, *forward scatter*.

Para evaluar la respuesta sistémica a la infección, se estudió la producción de citoquinas por los linfocitos T de bazo. Para esto se realizaron ensayos de re-estimulación *ex vivo* de esplenocitos de los animales controles e infectados, WT y *Clec4f*^{-/-}. La re-estimulación fue específica de antígeno, empleando líquido hidático (LH) como fuente de antígeno para los clones de linfocitos T amplificados durante la infección. Como control de esta re-estimulación se empleó medio solamente. La respuesta de linfocitos T se evidenció mediante la cuantificación de citoquinas típicas asociadas a las diferentes ramas de la respuesta adaptativa de tipo efector, es decir, IFN- γ (T_H1), IL-5 e IL-13 (T_H2), IL-17 (T_H17), así como de IL 10 y TGF- β (componentes importantes de las respuestas reguladoras).

Finalmente, a nivel de la respuesta en hígado se evaluó solamente la expresión de la molécula co-inhibitoria PD-L1 y de marcadores del fenotipo M(IL-4) en KC y LSEC.

4.3.2.1 Estudio del papel de Clec4F en la respuesta inmune local

Con respecto a la carga parasitaria, si bien no se observaron diferencias significativas entre los animales WT y *Clec4f*^{-/-} infectados, se observó una tendencia hacia menores cargas en los *Clec4f*^{-/-} que en los WT, la cual se repitió consistentemente en los tres experimentos de infección (los dos de 7 meses p.i y el de 9 meses p.i) (Figura 4.45).

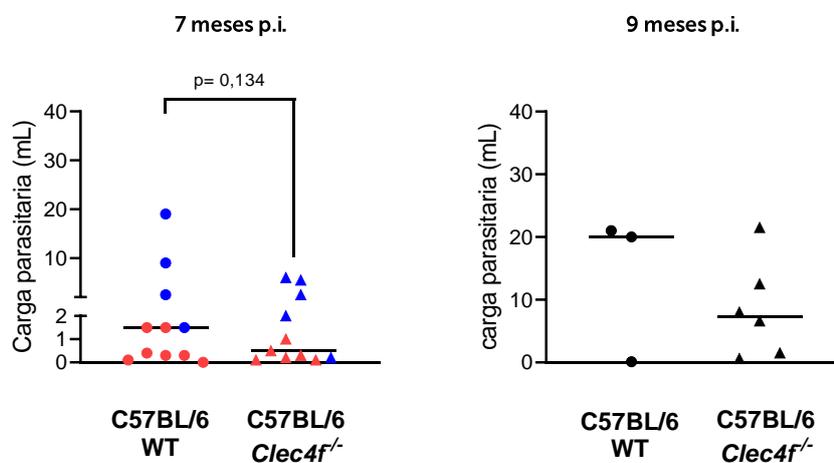


Figura 4.45. Tras la infección experimental con *E. granulosus s.s.*, los ratones *Clec4f*^{-/-} tienden a tener menores cargas parasitarias que los ratones WT. Se infectaron ratones C57BL/6 WT o *Clec4f*^{-/-} con 2500 PSC de *E. granulosus s.s* vía i.p., luego de 7 o 9 meses se sometió a los animales a eutanasia. La carga parasitaria de cada individuo se expresó como se describió en la Figura 1. Los resultados a los 7 meses p.i. corresponden a dos experimentos independientes (mostrados en dos colores distintos) y el de 9 meses p.i. a un único experimento. Se muestran los datos de los ratones individuales y la mediana (global de los dos experimentos para los experimentos de 7 meses de infección). Los datos para los 7 meses de infección se analizaron por el test de Kruskal-Wallis. No se realizó análisis estadístico para el experimento de 9 meses p.i. dado el bajo número de ratones grupo experimental.

Del análisis de la celularidad de la cavidad peritoneal, se observó un aumento en el número de células totales tras los 7 y 9 meses p.i., el cual no se vio afectado por la ausencia de Clec4F (Figura 4.46). El aumento en el número de eosinófilos y de las poblaciones de monocitos/macrófagos observado tras la infección tampoco se vio alterado por la ausencia de Clec4F, a excepción de una tendencia a un mayor número de LPM en los animales *Clec4f*^{-/-} comparados con los WT, a los 9 meses p.i.

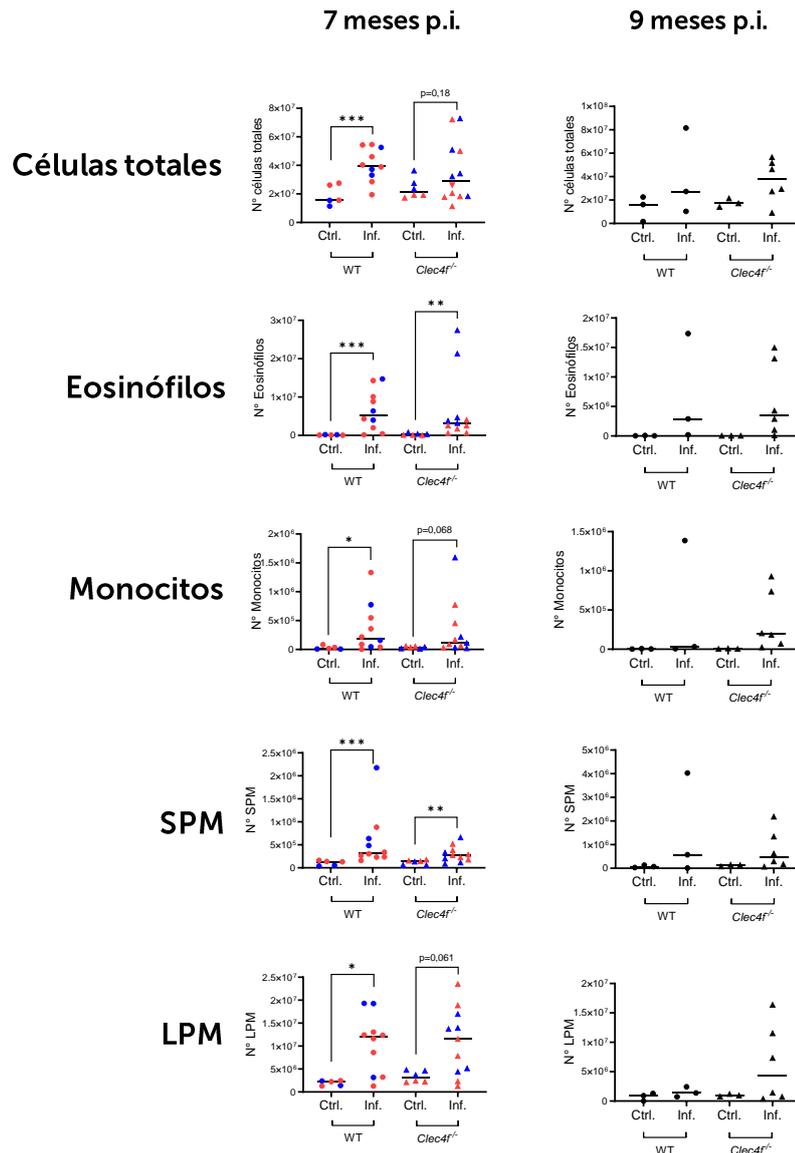
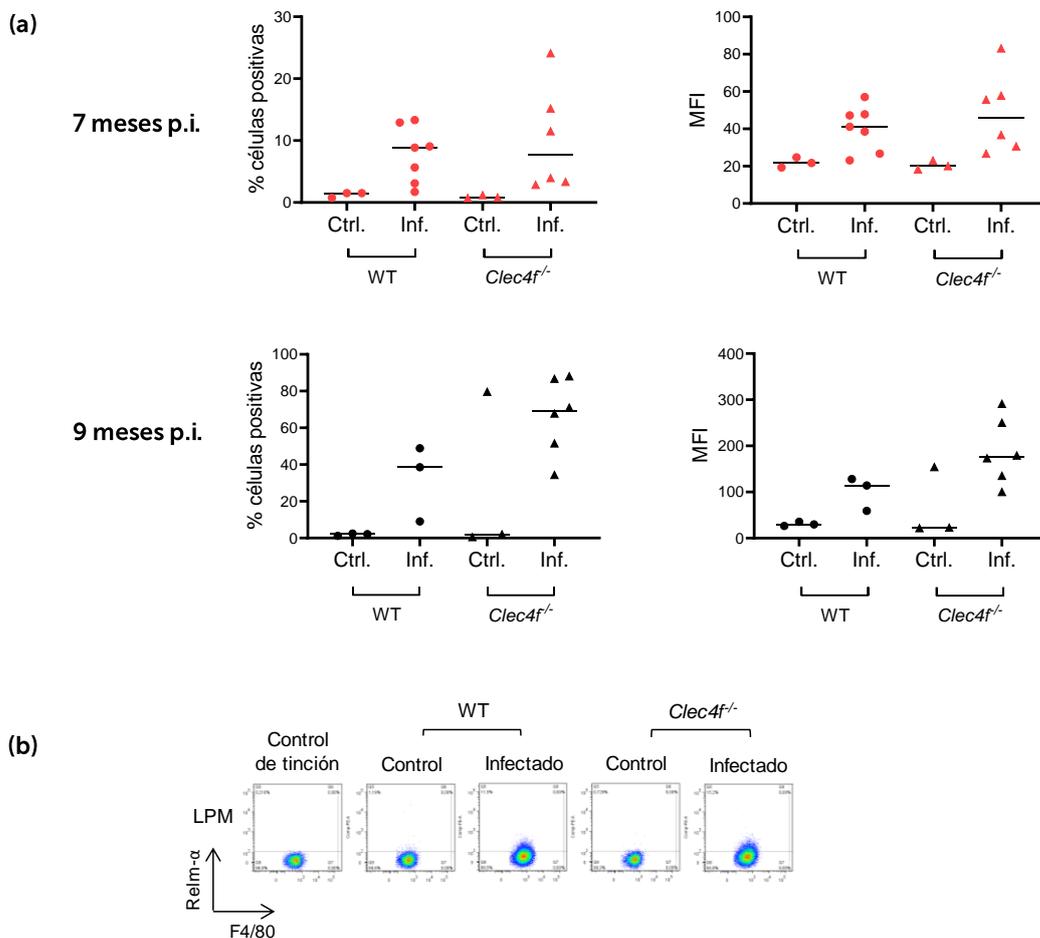


Figura 4.46. La ausencia de *Clec4F* no modifica los aumentos en los números de células de la cavidad peritoneal inducida durante la infección experimental i.p. por *E. granulosus*. Se infectaron ratones WT o *Clec4f*^{-/-} como se describió en la Figura 4.35 o se inyectaron ratones con PBS como control, y luego de 7 o 9 meses se sometió a los animales a eutanasia. Se recuperaron las células de la cavidad peritoneal mediante lavados peritoneales y, empleando un contador de células y citometría de flujo, se cuantificaron las células totales, así como las distintas poblaciones de monocitos/macrófagos (monocitos, SPM y LPM) y de eosinófilos. Los resultados de la infección 7 meses p.i. corresponden a dos experimentos independientes (mostrados en dos colores distintos) y el de 9 meses p.i. a un único experimento. Se muestran los datos de los ratones individuales y la mediana de los valores (que para los 7 meses de infección corresponden a los datos de los dos experimentos en conjunto). El análisis estadístico para los experimentos de 7 meses p.i. se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis con post-test de Conover y corrección de Benjamini y Hochberg para comparaciones múltiples. No se realizó análisis estadístico del experimento de 9 meses dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

Se evaluó la inducción del fenotipo M(IL-4) en las poblaciones de monocitos/macrófagos tras la infección, y el posible papel de Clec4F en dicha inducción. De forma preliminar, durante la infección se observó, a nivel de una tendencia, un aumento en la expresión del marcador de activación alternativa Relm- α en LPM, tanto en términos de porcentaje de células positivas como en *MFI*. Nuevamente, este aumento no se vio modificado por la ausencia de Clec4F a ninguno de los tiempos post-infección estudiados (Figura 4.47). No se detectó inducción de Relm- α en monocitos ni en SPM (datos no mostrados).



Ver leyenda de la Figura 4.47 en la siguiente página.

Figura 4.47. La ausencia de Clec4F no parece modificar la inducción de la expresión de Relm- α en LPM durante la infección experimental i.p. por *E. granulosus*. Se infectaron ratones WT o *Clec4f*^{-/-} como se describió en la Figura 4.35 o se inyectaron ratones con PBS como control, y luego de 7 o 9 meses se les sometió a eutanasia. Se recuperaron las células de la cavidad peritoneal y se evaluó en éstas la expresión de Relm- α por citometría de flujo de células permeabilizadas. (a) Se muestran los resultados para la expresión del marcador en LPM en términos de porcentaje de células positivas y de MFI, para ambos tiempos post-infección. El umbral de fluorescencia se estableció empleando un control de tinción en el cual solo se omitió el anticuerpo primario. Para ambos tiempos post-infección se grafican los datos de un único experimento; en el caso de los 7 meses p.i. se muestran los datos del experimento con menor carga parasitaria (mostrado en color rojo en la Figura 4.40); se muestran los valores de los ratones individuales y las medianas. (b) Se muestran *dot plots* representativos para la señal de Relm- α en LPM del experimento de 7 meses p.i.. No se realizó análisis estadístico dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

A continuación, se evaluó la expresión de PD-L1 en LPM, SPM y monocitos. Como se muestra en la Figura 4.48, la infección indujo un aumento en la expresión de PD-L1 en LPM y SPM (en términos de porcentaje de células positivas, así como en *MFI*). Sin embargo, nuevamente, la ausencia de Clec4F no modificó la expresión de este marcador en LPM ni SPM, a ninguno de los tiempos post-infección ensayados.

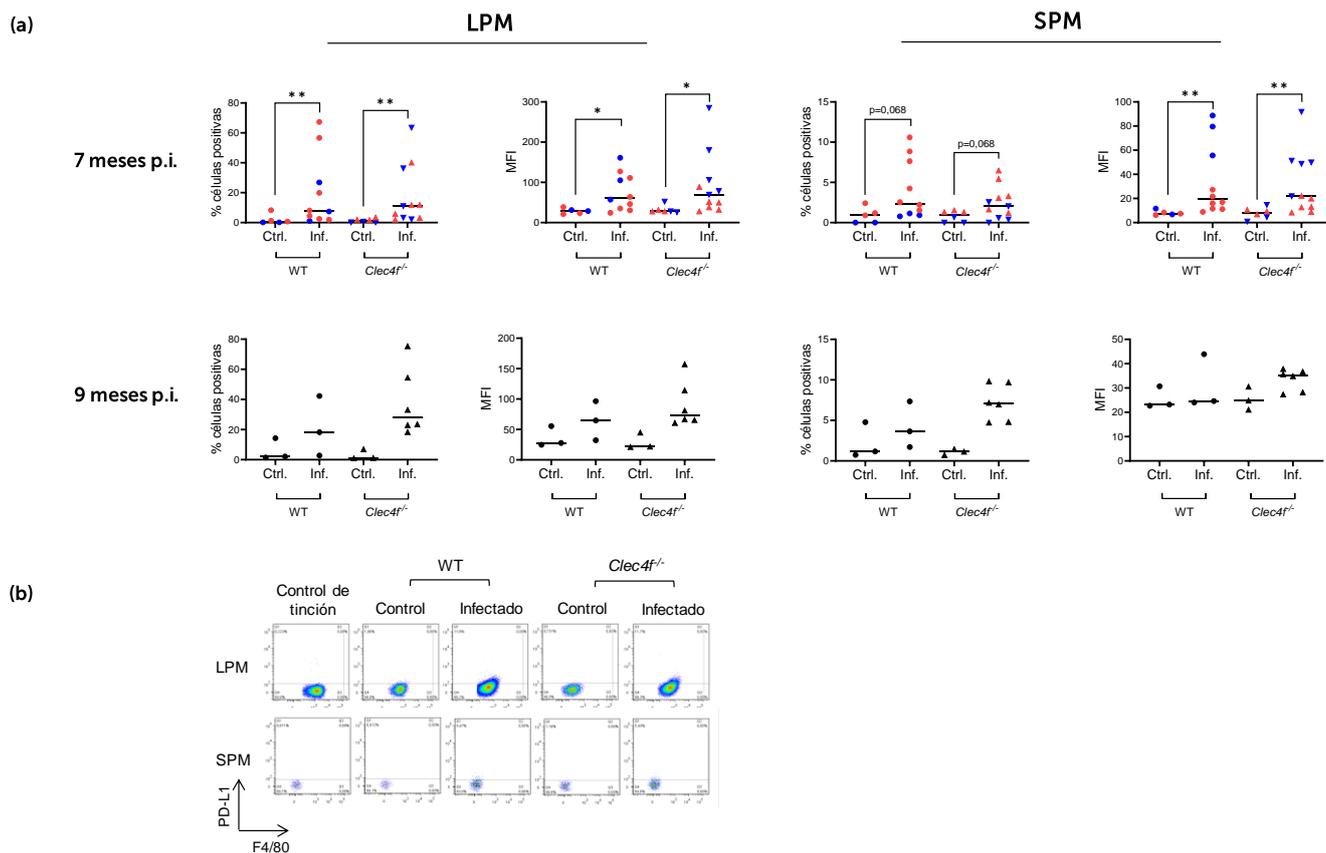


Figura 4.48. La ausencia de Clec4F no modifica la inducción de la expresión de PD-L1 en LPM y SPM durante la infección experimental por *E. granulosus*. Se infectaron ratones WT o *Clec4f*^{-/-} como se describió en la Figura 4.35 o se inyectaron ratones con PBS como control, y luego de 7 o 9 meses se los sometió a eutanasia. Se recuperaron las células de la cavidad peritoneal y se evaluó en estas la expresión de PD-L1 por citometría de flujo. (a) Se muestran los resultados para la expresión del marcador en LPM y SPM en términos de porcentaje de células positivas y de MFI para ambos tiempos post-infección. El umbral de fluorescencia se estableció empleando un control de tinción en el cual solo se omitió el anticuerpo anti-PD-L1. Los resultados de la infección 7 meses p.i. corresponden a dos experimentos independientes (mostrados en dos colores distintos) y el de 9 meses p.i. a un único experimento. Se muestran los valores de los ratones individuales y las medianas de los resultados (que en el caso de los 7 meses de infección corresponden a los dos experimentos en conjunto). (b) Se muestran *dot plots* representativos para la señal de PD-L1- α en LPM y SPM. El análisis estadístico para los experimentos de 7 meses p.i. se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis, con post-test de Conover para comparaciones múltiples. No se realizó análisis estadístico para el experimento de 9 meses p.i. dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

Ninguno de los parámetros evaluados en la cavidad peritoneal correlacionó con las cargas parasitarias, ni para los animales WT ni para los *Clec4f*^{-/-} infectados.

La caracterización de la respuesta inmune local en el modelo de infección experimental intraperitoneal en animales C57BL/6 WT fue reportada por nuestro grupo de investigación recientemente⁸¹. La observación en la presente Tesis de términos de aumentos de números de eosinófilos y poblaciones de monocito-macrófagos, así como inducción de Relm- α en LPM y de PD-L1 en LPM y SPM, coinciden con los reportados por el grupo, y adicionalmente muestran que esos cambios no se ven alterados por la ausencia de Clec4F.

4.3.2.2 Estudio del papel de Clec4F sobre la respuesta sistémica y específica de antígeno de los linfocitos T

Como se muestra en la Figura 4.49, tras la re-estimulación de esplenocitos con LH se detectó la producción de IL-5, IL-13 e IL-10 en el caso de los animales infectados, sin observarse respuesta en los animales control, por lo que la respuesta de citoquinas fue específica de antígeno. No se detectó la secreción de IFN- γ , IL-17 ni de TGF- β en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas. Por lo tanto, se trató de una respuesta T_H2 (IL-5 e IL-13) con un componente regulador (IL-10).

En forma similar a lo observado a nivel de la cavidad peritoneal (Figuras 4.46-4.48), la ausencia de Clec4F no modificó la respuesta específica a la infección de los linfocitos T. Se observó una correlación positiva entre los niveles de producción de IL-10 y de IL-13, tanto para los animales WT como para los *Clec4f*^{-/-} infectados ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente). No se observó correlación entre los niveles de producción de las distintas citoquinas con las cargas parasitarias, ni para ratones WT ni para *Clec4f*^{-/-} infectados.

4.3.2.3 Estudio del papel de Clec4F sobre respuestas a nivel de la FNPH

Por analogía con lo observado en las poblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal, en la presente Tesis se estudió si en la infección experimental también se induce un fenotipo M(IL-4) en las KC, y si el mismo se ve afectado por la ausencia de Clec4F. Se evaluó entonces, de forma preliminar, la expresión de marcadores de activación alternativa (Relm- α y CD206). Como se muestra en la Figura 4.50, a los 7 meses p.i., no se observó un aumento en la expresión de Relm- α en las KC. Sin embargo, se observó, a nivel de tendencia, un aumento en la expresión de Relm- α en las LSEC (tanto en términos de porcentaje de células positivas como en *MFI*). Este aumento en la expresión del marcador en respuesta a la infección, no se vio modificado por la ausencia de Clec4F. No se observaron cambios en la expresión de CD206 en KC ni LSEC tras la infección (datos no mostrados).

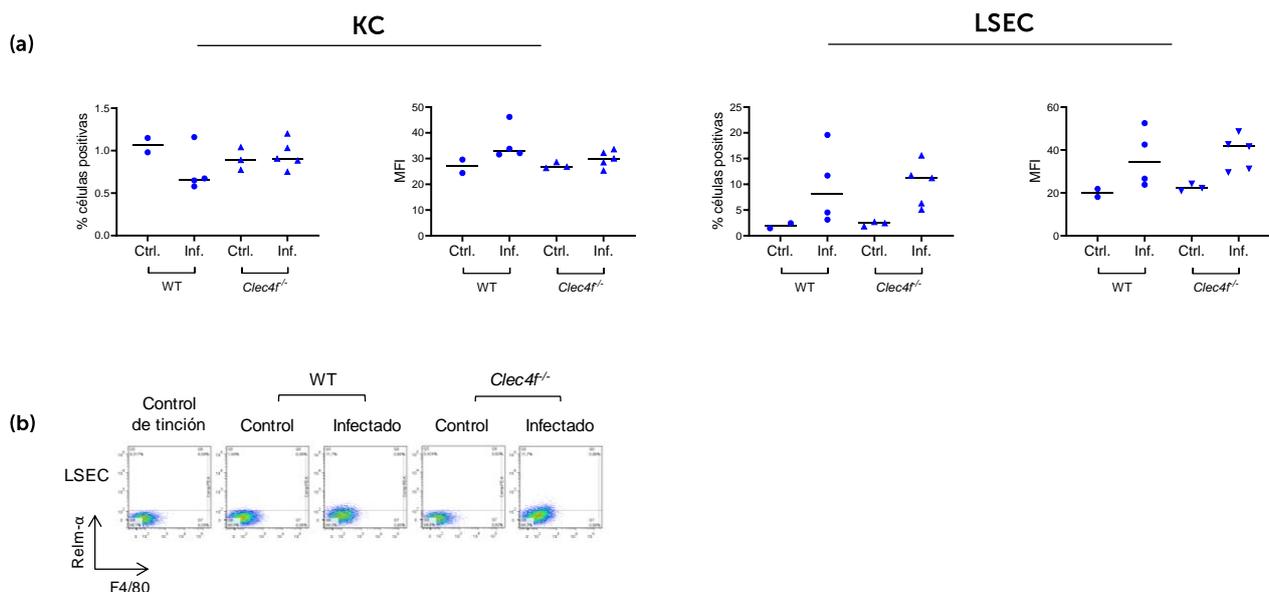


Figura 4.50. La infección por *E. granulosus* parece aumentar la expresión de Relm- α en LSEC. Se infectaron ratones WT o *Clec4f*^{-/-} como se describió en la Figura 4.35 o se inyectaron ratones con PBS como control. Luego de 7 meses se sometió a los animales a eutanasia, y se analizó la expresión de Relm- α en KC y LSEC por citometría de flujo de células permeabilizadas. (a) Se muestran gráficos correspondientes a un único experimento con los valores de cada individuo así como las medianas de los valores correspondientes, en términos de porcentaje de células positivas (a) y de *MFI*. (b) Se muestran *dot plots* representativos para la señal de Relm- α en LSEC. No se realizó análisis estadístico dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

Finalmente, se estudió la expresión de PD-L1 en KC y LSEC. Tanto las KC como las LSEC expresan PD-L1 de forma constitutiva, y dicha expresión está asociada a la inducción de respuestas tolerogénicas contra antígenos presentados en el hígado^{129,132}. En este trabajo era de interés evaluar la expresión de esta molécula co-inhibitoria dado su expresión potenciada en macrófagos de la cavidad peritoneal tras la inyección i.p. de pLL (datos del grupo no publicados), así como en el contexto de la infección experimental (Figura 4.48 y ⁸¹). Como se muestra en la Figura 4.51, tras 7 meses p.i. se observó un aumento significativo en la expresión de PD-L1 en las KC, tanto en términos de porcentaje de células positivas como en *MFI*. Interesantemente este aumento, a diferencia de todos los demás parámetros de la respuesta inmune analizados hasta el momento, ocurrió en las KC de los animales WT y no así en los *Clec4f*^{-/-}. Si bien este resultado parece acompañar el patrón observado para la captación de materiales de la LL por las KC (Figura 4.40), no se detectó correlación entre los datos de la expresión de PD-L1 y la captación de materiales de la LL por las KC, así como tampoco existió correlación de la carga parasitaria con la expresión de PD-L1 en KC. Tras 9 meses p.i., se observó la misma tendencia que a los 7 meses p.i. en cuanto a la expresión de PD-L1 en KC, a pesar de existir mayor dispersión en los datos. La expresión de PD-L1 en las LSEC no se vio afectada por la infección a ninguno de los tiempos analizados.

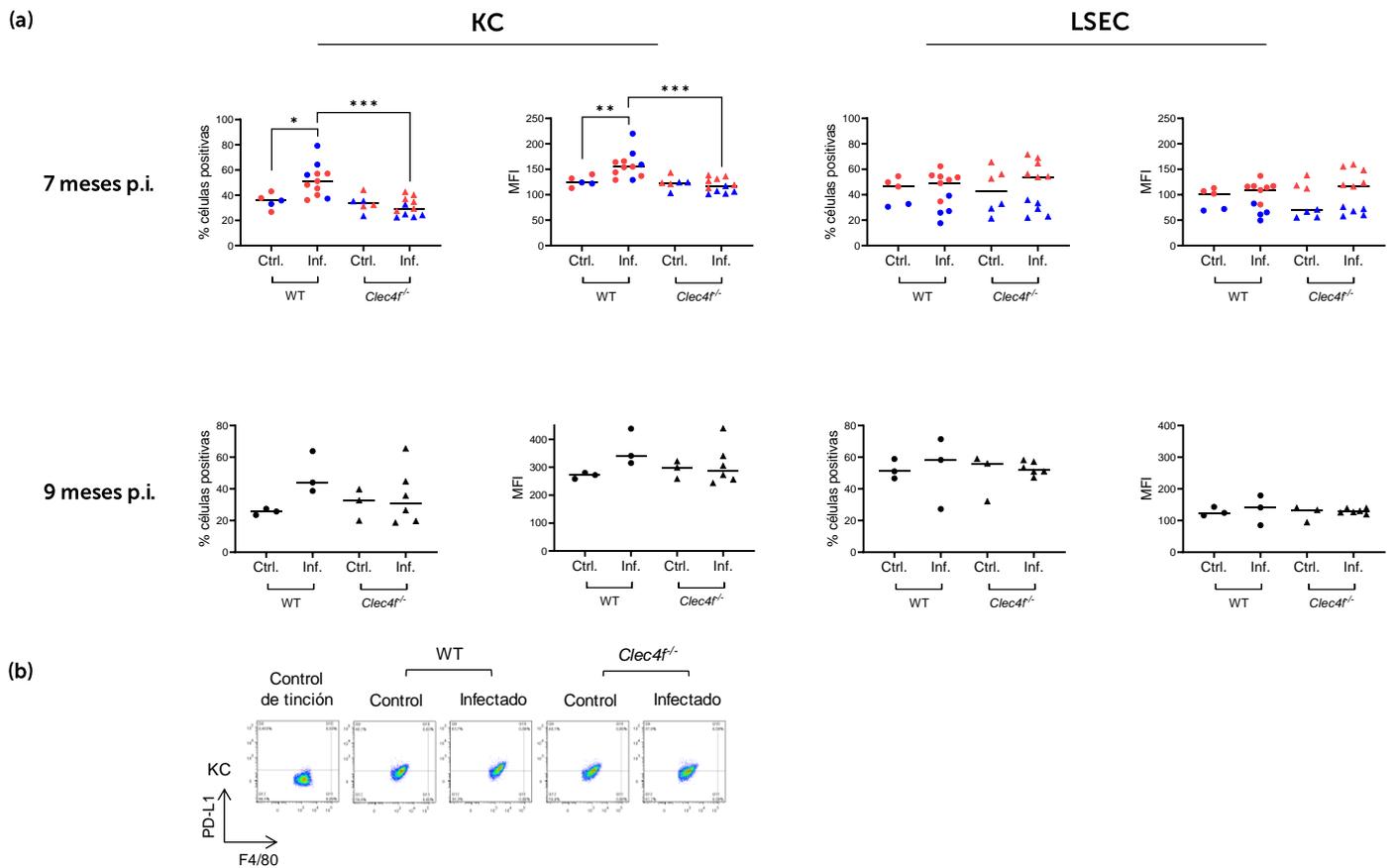


Figura 4.51. La infección por *E. granulosus* aumenta significativamente la expresión de PD-L1 en las KC, en forma dependiente de *Clec4F*. Se infectaron ratones WT o *Clec4f^{-/-}* como se describió en la Figura 4.35 o se inyectaron ratones con PBS como control. Luego de 7 o 9 meses se sometió a los animales a eutanasia y se analizó la expresión de PD-L1 en KC y LSEC por citometría de flujo. (a) Se muestran gráficos con los valores de cada individuo así como las medianas correspondientes en términos de porcentaje de células positivas y de *MFI*. (b) Se muestran *dot plots* representativos para la señal de PD-L1 en KC. Los resultados de la infección 7 meses p.i. corresponden a dos experimentos independientes (mostrados en dos colores distintos) y el de 9 meses p.i. a un único experimento. El análisis estadístico para los experimentos de 7 meses p.i. se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis, con post-test de Conover para comparaciones múltiples. No se realizó análisis estadístico para el experimento de 9 meses p.i. dado el bajo número de ratones por grupo experimental.

La infección por *E. granulosus* no pareció afectar el número de KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC recuperadas, ni a los 7 meses p.i. ni a los 9 meses p.i. (Figura 4.52). En forma similar a lo observado previamente (Figuras 4.32-4.34), se apreció un mayor número de KC recuperadas en los animales *Clec4f^{-/-}* que en los WT, independientemente de la infección, si bien la diferencia alcanzó significancia estadística solo en el caso de los

animales infectados, probablemente debido que los grupos infectados contaban con mayores números de individuos (Figura 4.52).

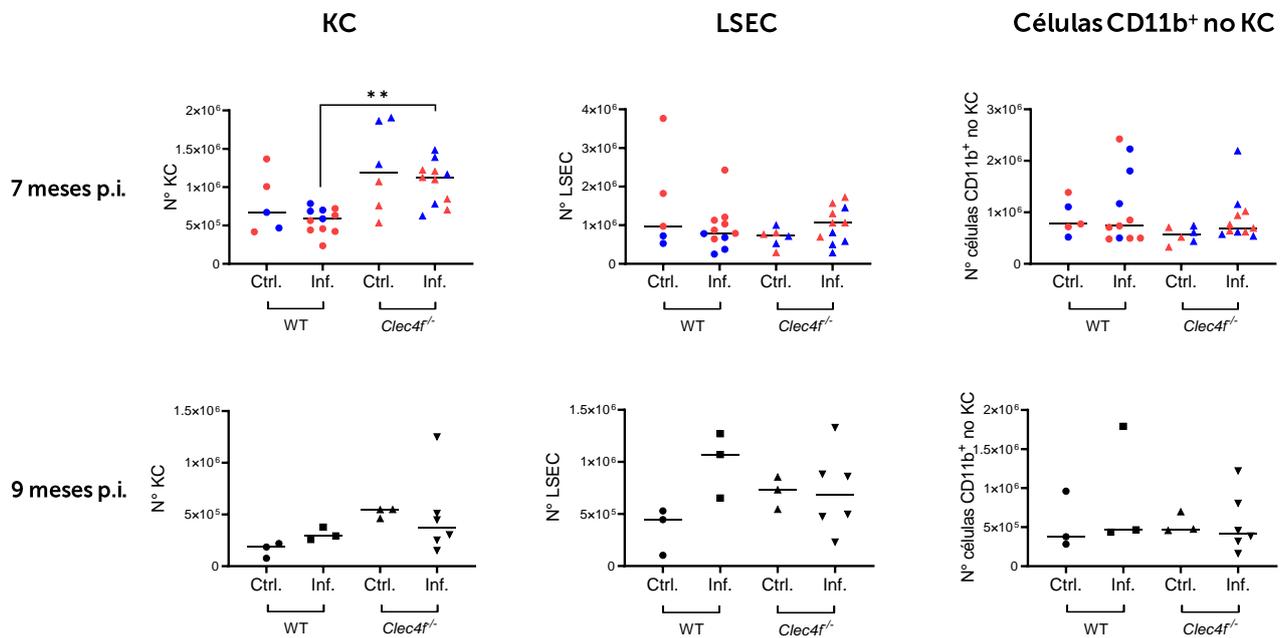


Figura 4.52. La infección por *E. granulosus* no cambia significativamente el número de células de la FNPH recuperadas luego del procesamiento del órgano para citometría de flujo. Se infectaron ratones WT o *Clec4f*^{-/-} como se describió en la Figura 1 o se inyectaron ratones con PBS como control. Luego de 7 o 9 meses se sometió a los animales a eutanasia y se cuantificó las células de la FNPH recuperadas utilizando un contador de células y citometría de flujo. Se grafican los datos para KC, LSEC y células CD11b⁺ no KC. Los resultados de la infección 7 meses p.i. corresponden a dos experimentos independientes (mostrados en dos colores distintos) y el de 9 meses p.i. a un único experimento. Se muestran los valores de cada individuo, así como las medianas de los dos experimentos en su conjunto (o del único experimento). El análisis estadístico para los experimentos de 7 meses p.i. se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis, con post-test de Conover para comparaciones múltiples. No se realizó análisis estadístico para el experimento de 9 meses p.i. dado el bajo número de ratones por grupo experimental. Otros datos del grupo indican que la diferencia significativa entre animales infectados WT y *Clec4f*^{-/-} observada en la recuperación de KC es independiente de la infección; se presume que la no detección en el presente experimento de una diferencia significativa análoga en los ratones no infectados se debió al menor número de individuos en estos grupos.

En suma, tras 7 y 9 meses de infección crónica, la ausencia de Clec4F no afectó la celularidad ni la inducción del fenotipo M(IL-4) en macrófagos en el sitio de la infección. La ausencia de Clec4F tampoco afectó la respuesta específica de antígeno de los linfocitos T de bazo medida en términos de producción de citoquinas. Las únicas

alteraciones generadas por la ausencia de Clec4F durante la infección observadas hasta el momento fueron la ausencia de aumento en expresión de PD-L1 en KC, y una tendencia, repetida en los tres experimentos de infección analizados, hacia una menor carga parasitaria.

5 Discusión

La presente Tesis surge como una continuación del trabajo del grupo de investigación, iniciado hace varias décadas, con el cual se busca profundizar en la biología de *E. granulosus* larvario y, específicamente, en los mecanismos subyacentes a la adaptación a su hospedero. Resultados obtenidos previamente por el grupo mostraron que la LL es capaz de modular las respuestas de algunos tipos de células dendríticas y macrófagos (que no incluyeron a las KC), y que dicha modulación no depende de la interacción de un receptor celular dado con motivos definidos de la LL, y en cambio probablemente depende de propiedades fisicoquímicas de la LL⁸¹. De un trabajo también realizado por el grupo de investigación, surgió que, de un amplio panel de receptores de la inmunidad innata, solo Clec4F (expresado en roedores solo en KC), fue capaz de unirse fuertemente a glicanos de la LL de *E. granulosus* y de *E. multilocularis*¹⁰⁵. Este resultado sentó las bases para la realización de la presente Tesis. Dado que este resultado se obtuvo usando una versión recombinante dimérica del receptor en un ensayo en formato ELISA, en esta Tesis se buscó determinar si Clec4F nativo expresado en la superficie celular era capaz de interactuar con las mucinas de la LL.

5.1 Intentos de obtención de un modelo *in vitro* de macrófagos que expresen Clec4F

Para abordar los objetivos planteados en esta Tesis era práctico contar con un modelo de macrófagos que expresaran Clec4F. Esto permitiría realizar ensayos *in vitro*, con el receptor expresado en su conformación nativa trimérica, en los cuales sería relativamente sencillo evaluar la posible internalización de los materiales de la LL, así como eventuales cambios fenotípicos en los macrófagos asociados a la interacción Clec4F-LL. Para generar dicha herramienta de trabajo se podían purificar KC a partir de un modelo animal (ratón) y así obtener un cultivo primario de KC, o generar mediante transducción o transfección una línea celular de macrófagos que expresaran Clec4F. La primera opción mencionada fue abordada inicialmente pero fue luego descartada, tras resultados negativos, sumados a evidencia publicada que, tras la purificación de KC de

ratón, la expresión de Clec4F disminuye significativamente a las 24 horas de cultivo y desaparece casi completamente a los 3 días¹²⁷.

Se procedió entonces a poner a punto un modelo de macrófagos que expresaran Clec4F mediante transducción lentiviral o transfección de líneas comerciales de macrófagos de ratón. Contar con una línea celular presenta grandes ventajas, ya que permite disponer fácilmente de un gran número de células para realizar ensayos *in vitro*, además de evitar el uso de animales para obtener células primarias.

Como se describió en la sección 4.1 de Resultados, no se logró obtener una línea de macrófagos con expresión estable de Clec4F con ninguna de las estrategias de transducción empleadas (con y sin marcador de selección), así como tampoco una línea con expresión transitoria del receptor. Sin embargo, sí se logró expresar Clec4F en la línea celular epitelial empleada como control (HEK293T), aunque en una baja proporción del cultivo, lo que no permitía utilizar dichos cultivos para ensayos de unión en superficie.

Las dificultades encontradas por un lado coinciden con lo reportado en la bibliografía en cuanto a la dificultad que presentan los macrófagos para ser transfectados o transducidos^{171,177}. Pero además, la expresión del gen de resistencia a puomicina con el silenciamiento en simultáneo de Clec4F evidencia otro nivel de dificultad enfrentado, que podría explicarse en base a que la expresión forzada de Clec4F fuera “costosa” para los macrófagos y/o fuera dificultada por la ausencia de proteínas accesorias presentes en KC pero no otros tipos celulares de ratón. En concordancia con lo anterior, la línea celular de KC de ratón KC13-2 no expresa Clec4F¹²⁷.

Ante la imposibilidad de obtener un modelo de macrófagos con expresión estable, o tan siquiera transitoria, de Clec4F para ensayos *in vitro*, se procedió al trabajo en ratón *in vivo*.

5.2 Estudios de la interacción de Clec4F con las mucinas de la LL de *E. granulosus*.

Para evaluar la posible interacción de Clec4F con los glicanos de la LL y los eventuales efectos inmunes de dicha interacción, se plantearon dos aproximaciones experimentales. Estas fueron por un lado, la inyección a ratones WT y *Clec4f*^{-/-} de materiales de la LL exógenos, tanto en una presentación soluble (sLL) como particulada (pLL), y por otro lado, el modelo de infección secundaria experimental intraperitoneal en ratones de ambos genotipos. Con ambas aproximaciones se realizaron estudios de biodistribución y captación por células de materiales de la LL, haciendo foco principalmente en la FNPH; en la segunda aproximación, además de la captación de los materiales de la LL, se estudiaron parámetros de la respuesta inmune, en pos de identificar eventuales cambios asociados a la interacción Clec4F-LL.

5.2.1 Evaluación de la captación materiales de la LL exógenos por las células del hígado y de la biodistribución de los mismos.

La inyección de materiales de la LL de *E. granulosus s.s* exógenos a ratones WT y *Clec4f*^{-/-} constituyó una primera aproximación al estudio de la interacción de la LL con Clec4F, así como de la biodistribución de estos materiales. La captación por células del hígado fue analizada por citometría de flujo y/o por inmunohistoquímica, mientras que la biodistribución se analizó por inmunohistoquímica; en ambos casos se empleó PNA o el anticuerpo E492 como sondas para la detección de la LL, a excepción de algunos ensayos en los que el material inyectado se encontraba previamente biotinilado. Casi la totalidad de los experimentos de inyección de materiales de la LL (sLL y pLL) fueron realizados empleando materiales que carecían de los depósitos de InsP_6Ca , componente muy abundante de la LL⁴⁰. De esta manera se buscaba facilitar el estudio de la contribución de la interacción de los glicanos mucínicos con Clec4F a la posible internalización celular de materiales de LL por las KCs. Los resultados en su conjunto evidenciaron que los materiales de la LL inicialmente en la cavidad peritoneal (pLL) llegan a sitios distantes en el organismo, alcanzando el hígado. Además, mostraron que dentro del hígado, dichos

materiales son captados selectivamente por las KC en forma predominantemente dependiente de la integridad de los glicanos mucínicos y de Clec4F (Figuras 4.18 y 4.21).

Además de captación por KC, se observó internalización de materiales de la LL tanto por LSEC como por células CD11b⁺ no KC. En ambos casos, la internalización fue independiente de Clec4F como se espera, y en algunas condiciones experimentales, la misma fue mayor en ausencia de Clec4F, seguramente por una mayor disponibilidad de los materiales de la LL cuando estos no son captados por las KC a través de Clec4F (Figuras 4.11, 4.12, 4.14, 4.18 y 4.21). La captación de materiales por células CD11b⁺ no KC fue detectada tras la inyección intraperitoneal de pLL (Figuras 4.18 y 4.21), pero no tras la inyección intravenosa sLL (Figura 4.12). Esta diferencia sugiere que las especies liberadas *in vivo* desde las partículas de mayor tamaño (pLL) seguramente incluyan mayoritariamente pequeñas partículas, y no mucinas solubles como las presentes en la preparación sLL. Datos obtenidos posteriormente al desarrollo experimental de esta Tesis mostraron que las células CD11b⁺ no KC corresponden a monocitos y neutrófilos, que podrían ser reclutados a los sinusoides hepáticos en respuesta a las partículas de la LL que quedan retenidas/atrapadas en los sinusoides pero no a material soluble como sLL. Si bien no se observó un aumento en la frecuencia de estas células en la FNPH en respuesta a la inyección de pLL (Figura 4.19), dicho aumento podría no haberse detectado debido a la aplicación de perfusión del hígado, que podría estar removiendo parte de las células presentes en los sinusoides.

Por otro lado, era relevante estudiar la captación de una preparación de LL que contuviera todos los componentes mayoritarios presentes en la LL nativa, para modelar mejor lo que podría ocurrir en el contexto de la infección, tanto experimental como natural. Así, se realizó un experimento con una preparación de pLL que contenía, además de las mucinas, los depósitos de InsP₆.Ca (wpLL), analizándose solamente la captación a nivel de la FNPH (Figura 4.27). Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos previamente para pLL, es decir las KC permanecieron siendo el tipo celular predominante en la captación de los materiales de la LL, y dicha captación fue mayoritariamente dependiente de Clec4F. Sin embargo, si bien este resultado es preliminar, ya que corresponde a un único experimento, la captación de las mucinas de

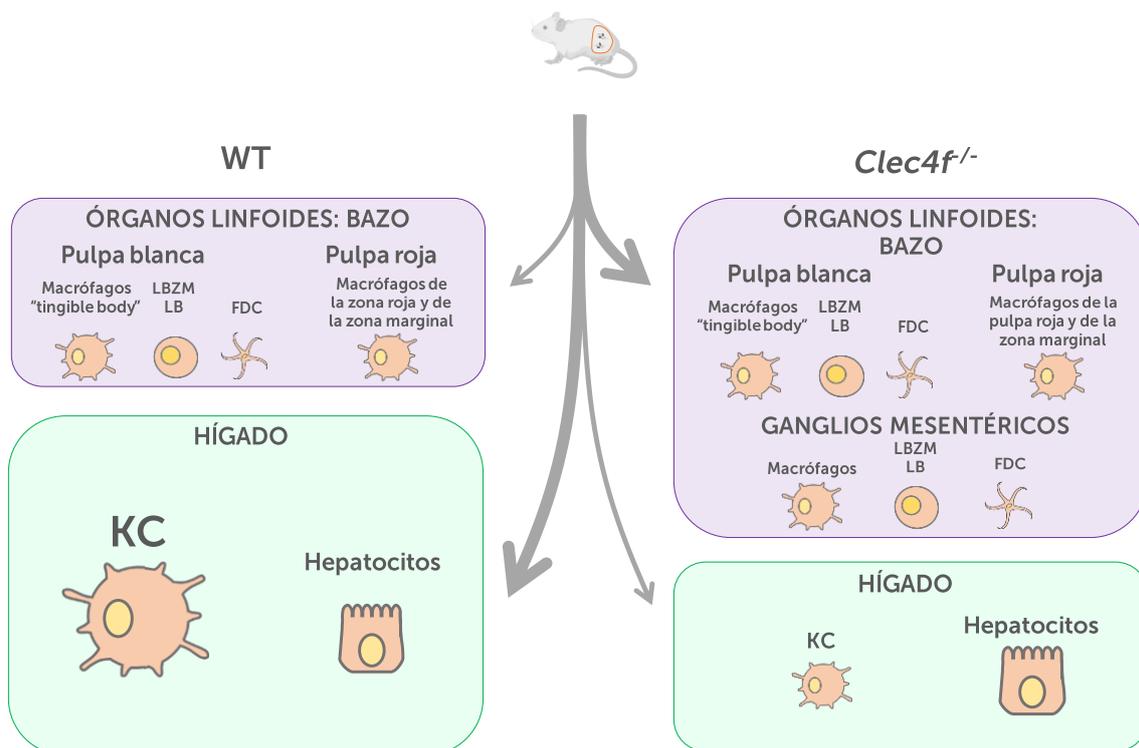
la LL por KC de animales *Clec4f^{-/-}* tendió a ser mayor tras la inyección de wpLL que la de pLL. Esto sugeriría que en ausencia de Clec4F la presencia del InsP₆.Ca en la LL podría contribuir a la captación del material por KC.

El estudio de la biodistribución de materiales de la LL luego de inyección de pLL en animales WT y *Clec4f^{-/-}* por métodos histológicos permitió, en primer lugar, confirmar que los materiales inyectados en la cavidad peritoneal llegan a sitios distantes del sitio de inoculación. En segundo lugar, este estudio amplió la información sobre la captación por las células del hígado. Específicamente, se observó captación de materiales de la LL por hepatocitos, tipo celular para el cual el grupo aún no ha puesto a punto el estudio por citometría de flujo. Los hepatocitos captan solamente ligandos solubles¹⁴⁵, por lo cual, la señal en hepatocitos tras la inyección de pLL (que contiene partículas con tamaños en el rango de los μm^{93}) debe corresponder a la internalización de mucinas solubles liberadas de las partículas *in vivo*. En forma concordante, datos obtenidos posteriormente al trabajo experimental de la presente Tesis confirmaron la internalización de sLL *in vivo* por hepatocitos (datos no mostrados). La captación por estas células no pareció diferir entre los genotipos estudiados (Figura 4.23). Si bien *a priori* esto no era lo esperado, ya que tanto las LSEC como las células CD11b⁺ no KC de los animales *Clec4f^{-/-}* captaron más materiales de la LL en animales *Clec4f^{-/-}* que en animales WT, seguramente debido una mayor disponibilidad de dichos materiales en ausencia de Clec4F, la detección histológica realizada no es cuantitativa. En tercer lugar, además de detectarse materiales en el hígado, se detectaron los mismos en localizaciones extra-hepáticas, específicamente en órganos linfoides, siendo mayor la señal en los animales *Clec4f^{-/-}* que en los WT (Figuras 4.23 y 4.24). La detección de materiales de la LL en órganos linfoides (en ganglios drenantes al sitio de infección) fue reportada en infecciones en humanos por *E. granulosus*⁹¹. Los autores determinaron que dentro de los ganglios, la señal de la LL estaba asociada a los folículos, y dentro de éstos, a las células dendríticas foliculares (*follicular dendritic cells*, FDC, del inglés). Las FDC son células especializadas en la retención a largo plazo, a través de receptores Fc y CR2, de antígenos opsonizados por anticuerpos y/o por componentes del complemento, respectivamente. Esta retención es necesaria para la maduración de la afinidad de los linfocitos B activados y la producción de anticuerpos específicos en la reacción del centro

germinal^{178,179}. En la presente Tesis, tras la inyección de pLL, se detectaron materiales de la LL en ganglios mesentéricos de animales *Clec4f^{-/-}*, y si bien no se emplearon marcadores para definir tipos celulares, se podría inferir que en ratón, los materiales de la LL también podrían estar asociados a las FDC. Como se discute más adelante, tanto en el contexto de la infección (experimental o natural) como tras la inyección de materiales de la LL exógenos, los materiales circulantes podrían ser opsonizados por acción del complemento y por anticuerpos naturales (de la clase IgG), y así interactuar con las FDC. De esta manera la acumulación de partículas en los ganglios tras la inyección de pLL podría conducir a la activación de linfocitos B. Se puede proponer que esta activación se vería favorecida en la ausencia de Clec4F, ya que en presencia del receptor el material es dirigido preferentemente a las KC. Por otro lado, por analogía a lo que sucede en el hígado, no se puede descartar que los materiales de la LL también se encuentren asociados a macrófagos presentes en los ganglios. También se detectaron materiales de la LL en el bazo, y dentro de éste en la pulpa blanca y en la pulpa roja, siendo mayor la señal en ambas localizaciones en los animales *Clec4f^{-/-}* que en los WT (Figura 4.24). El bazo es el órgano linfóide convencional más grande del cuerpo y actúa como un filtro de los patógenos y de componentes de estos presentes en la circulación sistémica, de forma similar a la capacidad que tiene el hígado de filtrar a la sangre proveniente del aparato digestivo. La pulpa blanca y la pulpa roja son los dos tejidos principales en los que está organizado el bazo¹⁸⁰. La pulpa blanca es tejido linfóide en el que se localizan principalmente linfocitos B y T y las FDC, tipos celulares que dan lugar a la reacción del centro germinal; en la pulpa blanca además se encuentran macrófagos encargados de remover cuerpos apoptóticos generados tras la reacción del centro germinal (*tingible body macrophages*)¹⁸⁰. La pulpa roja es un tejido conectivo en el cual se ubican los macrófagos de la zona marginal del bazo y los macrófagos de la pulpa roja, encargados en remover patógenos de la sangre y eritrocitos envejecidos, respectivamente¹⁸⁰. La marca de LL asociada a la pulpa blanca parece estar ubicada específicamente en los folículos (Figura 4.24); se puede especular que este material podría estar asociado a los *tingible body macrophages* y/o FDC. Por otro lado, dada la composición de los materiales de la LL (ricos en estructuras glucídicas repetidas), es concebible que los mismos puedan promover la producción de anticuerpos T-independientes; en este sentido, en infecciones experimentales por *E. multilocularis*, los

anticuerpos anti-LL producidos son mayoritariamente T-independientes⁷⁶. Ya que en el bazo este tipo de anticuerpos son producidos por los linfocitos B de la zona marginal (LBZM), la marca de la LL en la pulpa blanca del bazo también podría deberse a la asociación de los mismos con los LBZM. En cuanto al material ubicado en la pulpa roja, se puede especular que esté asociado a los macrófagos de la zona marginal y/o de la pulpa roja.

En suma, los datos obtenidos a partir de la inyección de pLL sugirieron que la presencia de Clec4F determina el direccionamiento a las KC de los materiales circulantes de la LL, y que cuando Clec4F no está, hay captación compensatoria por el bazo y ganglios (Figura 5.1). Los datos obtenidos no permitieron evaluar si la captación de materiales de la LL por las células de la cavidad peritoneal es afectada por la presencia/ausencia de Clec4F.



Ver leyenda de la Figura 5.1 en la siguiente página.

Figura 5.1. La presencia de Clec4F determina el direccionamiento a las KC de los materiales circulantes de la LL, y en ausencia de este receptor hay captación compensatoria por órganos linfoides secundarios. Se esquematiza la circulación de los materiales de la LL según se deduce del análisis las 24 horas de la inyección i.p. de pLL en animales WT y *Clec4f*^{-/-}. En animales WT la captación ocurre principalmente a nivel de hígado por las KC y en forma dependiente mayoritariamente de Clec4F, habiendo además captación por hepatocitos. En forma secundaria también se detectan materiales de la LL en bazo, en la pulpa blanca y en la pulpa roja. En la pulpa blanca, los materiales parecen estar asociados a los folículos y en estos, a nivel de hipótesis, podrían estar asociadas a FDC, linfocitos B (LB), linfocitos de la zona marginal del bazo (LBZM) y a macrófagos “*tingible body*”. En la pulpa roja los materiales de la LL podrían, a nivel de hipótesis, estar asociados a los macrófagos de la pulpa roja o de la zona marginal. En cambio, en los ratones *Clec4f*^{-/-} los materiales de la LL se concentran en los órganos linfoides secundarios, detectándose señal además de en bazo, en ganglios mesentéricos. En estos últimos, y en otros ganglios drenantes de la cavidad peritoneal, la señal podría estar asociada, en forma análoga a lo descrito para los folículos en bazo, a los LB, LBZM y a los macrófagos presentes en los ganglios.

5.2.2 Estudio del papel de Clec4F en la captación de materiales de la LL durante la equinocosis quística experimental.

La captación de materiales de la LL exógenos por KC en forma dependiente de Clec4F, junto con la evidencia de que en infecciones en humanos por *E. granulosus* hay partículas de la LL tanto en el sitio donde se aloja el parásito como en los ganglios drenantes⁹¹, condujeron a estudiar si Clec4F también era relevante en la captación de materiales de la LL en la infección experimental en ratón, y de ser así, si dicha captación tenía efectos sobre la respuesta inmune en este modelo. Cabe destacar que si bien existe un modelo de equinocosis experimental intrahepática en ratón, que implica la inyección de PSC directamente en la vena porta^{181,182}, el mismo no ha sido puesto a punto en el laboratorio. Sin embargo, el grupo de trabajo cuenta con vasta experiencia en el modelo de infección experimental secundaria intraperitoneal. En este último, el control inflamatorio observado en los hospederos naturales se reproduce en buena medida^{81,183}. Entonces, para abordar este objetivo, se infectaron con PSC por vía intraperitoneal ratones de la cepa Balb/c, o de la cepa C57BL/6 WT o *Clec4f*^{-/-}. Las infecciones se mantuvieron por 7 o 9 meses, tras lo cual se analizó la señal de LL en la FNPH así como la biodistribución de los materiales de la LL, en forma similar a lo hecho tras la inyección de pLL.

La cepa Balb/c es más susceptible a la infección por *E. granulosus* que la cepa C57BL/6^{175,176}, y los datos obtenidos en cuanto a las cargas parasitarias desarrolladas en ambas cepas confirmaron esta observación (Figura 4.35). Las menores cargas parasitarias desarrolladas por los animales C57BL/6 probablemente impidieron la detección por inmunohistoquímica de los materiales de la LL. Así, solamente se obtuvieron datos sobre la biodistribución de los materiales de la LL en los animales Balb/c infectados.

Los resultados mostraron que, en forma similar a lo observado tras la inyección de pLL/sLL, en la infección experimental intraperitoneal, los materiales de la LL fueron detectados por citometría de flujo principalmente en las KC de los animales WT de ambas cepas. Las infecciones de 7 y 9 meses realizadas en C57BL/6 WT y *Clec4f*^{-/-} evidenciaron además, que dicha captación de materiales por KC era mayoritariamente dependiente de Clec4F. También se observó cierto nivel de captación independiente de Clec4F por KC, que fue mayor a los 9 meses que a los 7 meses post-infección. Esto podría explicarse si a este tiempo más prolongado de infección se ven aumentados los mecanismos de captación mediados por opsonización por anticuerpos/complemento, que se discuten más adelante. A diferencia de lo observado tras la inyección de pLL, en la infección experimental no se detectó captación por LSEC ni por células CD11b⁺ no KC. Esto se explicaría si la internalización por estos tipos celulares se volviera relevante solo cuando la capacidad de captación de las KC se viera saturada, lo cual podría no suceder en el contexto de la infección, en el que es esperable que haya una liberación de materiales de la LL constante pero a bajos niveles, a diferencia de lo que ocurre cuando se inyecta un “bolo” de pLL o de sLL y se analiza a las 22 hs. Los resultados obtenidos con los ratones Balb/c, en los que se apreció una tendencia (que no llegó a ser significativa) a una captación de materiales de la LL por las células CD11b⁺ no KC, podrían apoyar este planteo, ya que en estos ratones, como se dijo, las cargas parasitarias fueron más elevadas que en los C57BL/6 (Figura 4.35).

Como se mencionó previamente no se pudo contar con datos histológicos de animales C57BL/6 WT y *Clec4f*^{-/-} infectados para evaluar de forma comparativa la ubicación de los materiales de la LL liberados durante la infección, como se hizo tras la inyección de pLL.

Sin embargo, los datos obtenidos de la infección experimental de animales Balb/c WT mostraron que, de forma similar a lo observado en las infecciones naturales en humanos y tras la inyección de pLL, los materiales de la LL liberados por el crecimiento del parásito son detectados en la vecindad del mismo (en este caso en la cavidad peritoneal) así como en sitios distantes al mismo (Figura 4.36). Entre los sitios distantes al sitio de infección, de forma similar a lo observado tras la inyección de pLL en animales WT, las mucinas de la LL liberadas durante la infección fueron detectadas principalmente en el hígado, y específicamente en las KC (Figura 3.36). Además, datos obtenidos de un ratón infectado con alta carga parasitaria (21 ml), mostraron la captación de mucinas de la LL por hepatocitos, no detectada en un ratón con menor carga parasitaria (16 ml) (Figura 4.37). Esto podría ir en similar sentido a lo mencionado previamente con respecto a la ausencia de señal de la LL en LSEC y en células CD11b⁺ no KC en los animales C57BL/6 infectados, es decir que solo se detectaría la captación por los hepatocitos cuando la capacidad de las KC de internalizar materiales se viera saturada. La captación por hepatocitos implicaría que, durante la infección experimental, además de materiales de la LL de naturaleza particulada, se liberarían mucinas de la LL solubles. Como se comentó previamente, también se detectaron materiales de la LL en órganos linfoides secundarios, específicamente en ganglio mesentérico y bazo. En este último, la señal pareció estar asociada a la pulpa roja, donde, a nivel de especulación, podría estar asociada a los macrófagos de la zona marginal y de la pulpa roja, como se discutió para la inyección de pLL.

En suma, tanto en la infección secundaria experimental intraperitoneal, como luego de la inyección de materiales de la LL exógenos, las mucinas de la LL son detectadas en el sitio en el que se encuentran inicialmente (cavidad peritoneal), pero además circulan por el organismo, alcanzando el hígado, donde son captados selectivamente por las KC, en forma mayoritariamente dependiente de Clec4F. Además, dichos materiales también son detectados en órganos linfoides secundarios de animales infectados/inyectados.

5.2.3 Capacidad endocítica de Clec4F

Hasta la fecha no hay evidencias reportadas en la bibliografía que indiquen que Clec4F sea efectivamente un receptor endocítico. Con los datos obtenidos en la presente Tesis tampoco es posible afirmar o descartar que Clec4F sea efectivamente un receptor endocítico, si bien se determinó que participa en la captación de los materiales de la LL por las KC. Clec4F no contiene motivos de señalización conocidos, por lo que de mediar la internalización de ligandos en forma directa, requeriría de proteínas accesorias^{106,108}. Como se mencionó en la Introducción, en ratones, Clec4F es indispensable para la captación por KC de plaquetas desialiladas^{123,124}, pero esta función requiere la participación adicional de al menos una de las lectinas MGL y/o ASGR^{124,126}, también expresadas en las KC. Estas lectinas presentan una especificidad por residuos con Gal terminales, relacionada a la de Clec4F^{119,126}. En este escenario, los autores citados proponen, sin mayor evidencia experimental que la ya mencionada, un mecanismo en el cual el contacto inicial (*tethering*) con las plaquetas desialiladas sería a través de MGL y/o ASGR, lo cual acercaría el ligando a Clec4F, y que éste junto a MGL mediarían la unión fuerte para la posterior internalización de la plaqueta desialilada¹²⁴. Sin embargo, dada la característica gran longitud del *coil-coiled* de Clec4F¹¹⁷, sumado a la ausencia de motivos de señalización en este receptor pero la presencia de estos motivos en MGL y ASGR^{184,185}, es tentador especular que Clec4F participaría en el contacto inicial con materiales de la LL y otros ligandos en circulación, acercándolos a MGL y/o ASGR, que entonces mediarían la internalización. Si bien los datos de Hsu *et al.* 2013¹⁰⁵ no aportan evidencia clara de unión de las mucinas de la LL a ASGR ni MGL (en sus versiones recombinantes diméricas humanas), dada la gran abundancia de motivos basados en Gal terminales presentes en éstas, no se puede descartar la posibilidad de que ASGR y/o MGL de ratón nativos se unan a las mucinas de la LL y participen en su internalización por KC, en colaboración con Clec4F de la forma antes mencionada. Este modelo de colaboración de receptores podría explicar por qué Clec4F expresado por transfección en dos líneas celulares diferentes media unión a ligandos pero no internalización de los mismos^{119,186}. En suma, sería relevante evaluar si Clec4F es o no es internalizado en las KC junto con el material de LL, y si la captación de este material dependiente de Clec4F además requiere de MGL y/o ASGR.

5.2.4 Posibles receptores involucrados en los mecanismos de captación de materiales de la LL independientes de Clec4F

Tanto luego de la inyección de materiales de la LL exógenos como en el contexto de la infección secundaria experimental, se detectó captación de los materiales por KC de forma independiente de Clec4F, así como captación por otros tipos celulares presentes en el hígado (LSEC, células CD11b no KC y/o hepatocitos), cavidad peritoneal y en órganos linfoides secundarios.

La captación de materiales de la LL en forma independiente de Clec4F podría estar mediada por diferentes receptores en los distintos tipos celulares relevantes, los cuales se discuten a continuación. Los componentes intrínsecos de la LL, como fue descrito en la sección 1.2.4 de la Introducción, corresponden a las mucinas y los depósitos de InsP_6Ca . Además, la LL contiene anticuerpos del hospedero del cual se obtuvo el material, unidos a los componentes intrínsecos. Todos estos componentes pueden ser reconocidos por receptores celulares que medien internalización. Las mucinas de la LL podrían ser reconocidas por anticuerpos naturales anti-carbohidratos, de isotipo IgM principalmente, pero también IgG⁶⁹. Además, en el contexto de la infección crónica, las mucinas de la LL están opsonizadas por anticuerpos específicos producidos durante la infección^{69,70}. Los anticuerpos podrían mediar la internalización mediante receptores Fc presentes en las KC, LSEC, las células CD11b⁺ no KC, y por otros fagocitos del organismo, incluyendo aquellos presentes en cavidad peritoneal, ganglios y bazo. A su vez, este reconocimiento por anticuerpos podría dar lugar a la activación de la vía clásica del complemento, lo cual conduciría al depósito de las opsoninas C3b/iC3b/C4b sobre la LL⁶⁹. C3b/iC3b podrían ser reconocidos por receptores de complemento, incluyendo CR1g, altamente expresado en KC e importante para la captación por estas células de partículas circulantes^{141,173}. Por otro lado, el componente InsP_6Ca , presente tanto en la preparación denominada wpLL como en las partículas liberadas de la LL durante la infección, une directamente C1q, dando inicio a una activación limitada de la vía clásica del complemento con cierto nivel de depósito de C3b/iC3b/C4b^{69,100}. De esta forma, los materiales de la LL también podrían ser reconocidos e internalizados por células que presenten receptores celulares que unan C1q, además de receptores para

C3b/iC3b/C4b, expresados tanto en células del hígado como en otras células inmunes del organismo^{173,187,188}. La internalización de materiales de la LL a través de complemento no sería relevante en las LSEC, ya que no se ha reportado la expresión de receptores para complemento en estas células¹³⁶. Como se mencionó previamente, ASGR y MGL, con especificidad por ligandos con Gal terminales, también se expresan en las KC y no se puede descartar que medien la captación de materiales de la LL por las KC en forma independiente de Clec4F. Por su parte, los hepatocitos podrían captar materiales a través de ASGR.

Dado el amplio abanico de posibilidades para la captura de materiales de la LL de forma independiente de Clec4F, tanto por KC como por otros tipos celulares, es muy destacable el papel dominante de Clec4F en la captación de dichos materiales por las KC, que surge de los resultados en el contexto de inyección de materiales exógenos de la LL y más aún en el modelo de infección secundaria experimental, en el cual, como se dijo, probablemente jueguen un papel los anticuerpos específicos.

5.2.5 Estudio de los posibles efectos de la ligación de Clec4F sobre las respuestas inmunes.

El reconocimiento de ligandos por parte de las CLRs de superficie celular puede promover la internalización de los primeros y/o cambios fenotípicos en las células involucradas¹⁰⁸. Con respecto a Clec4F, hasta la fecha no hay evidencias en la bibliografía que sugieran que la interacción de este receptor con sus ligandos genere señales que induzcan cambios fenotípicos en las KC. Estos cambios implicarían la posibilidad de señalización directa por Clec4F, así como a través de MGL/ASGR en las KC. Además, abarcan la posibilidad de que los productos de degradación de materiales internalizados (incluyendo los de la LL) modifiquen el metabolismo de las KC, y que esto altere su funcionalidad. Por otro lado, también podrían existir efectos indirectos, es decir que la ausencia de Clec4F permita tanto la interacción de los materiales de la LL con otros receptores en las propias KC como con otros tipos celulares. A continuación, se discuten los resultados de la evaluación, preliminar, realizada en el contexto de esta Tesis, de la posibilidad de efectos sobre las respuestas inmunes mediados por la interacción Clec4F-

LL, tras la inyección de materiales de la LL y en el contexto de la infección secundaria experimental.

5.2.5.1 Estudio preliminar sobre el papel de Clec4F en los posibles cambios en las células de la FNPH asociados con la internalización de materiales exógenos de la LL.

Resultados previos del grupo han demostrado que la inyección intraperitoneal de pLL (seguida de análisis a las 24 hs), así como la infección experimental secundaria intraperitoneal en ratón, promueven la expresión de moléculas inhibitorias (PD-L1, PD-L2, IL-1Ra) así como de marcadores de polarización M(IL-4) (Relm- α , Ym-1, arginasa-1, CD206) en las poblaciones de macrófagos presentes en la cavidad peritoneal (Grezzi 2024; datos del grupo no publicados). Estos antecedentes condujeron al estudio preliminar de la expresión de PD-L1, Ym-1 y/o CD206 en KC tras la inyección de sLL, pLL o wpLL en animales WT y *Clec4f*^{-/-}. Se evaluaron las mismas moléculas también en LSEC, ya que estas células a pesar de no ser células inmunes, pueden responder como tales, pudiendo aumentar, en respuesta a estímulos innatos, la expresión de moléculas inhibitorias y de marcadores M(IL-4)^{174,189}. No se estudió el fenotipo de las células definidas como CD11b⁺ no KC, ya que las mismas constituían un conjunto heterogéneo, que incluía a monocitos y neutrófilos. La captación de sLL por KC y LSEC no pareció modificar los niveles de PD-L1 basales en estas células, al menos al tiempo de análisis empleado. Solamente se apreció, a nivel de una tendencia, un aumento de la expresión de Ym-1 en las KC de los animales WT tras la inyección de sLL, tendencia que en LSEC se vio en ambos genotipos.

Los resultados recién mencionados, obtenidos en las KC, son contrastantes con los obtenidos en las poblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal, en los cuales, tras 24 h de la inyección tanto de pLL como de wpLL, aumenta la expresión de PD-L1 y de Ym-1 (datos del grupo no publicados). Este contraste podría deberse a varios motivos. En primer lugar, tras la inyección de pLL en la cavidad peritoneal, el entorno al que quedan expuestas las células allí presentes difiere del entorno en el que se encuentran las KC en el hígado. En este sentido, datos obtenidos por el grupo mostraron que la

inyección intraperitoneal de pLL, incluso a una dosis 3 veces menor que la empleada en esta Tesis, produce inflamación en la cavidad detectable a las 24 hs, con reclutamiento de eosinófilos, neutrófilos y monocitos, y desaparición de LPM¹⁹⁰. Este reclutamiento de células debe implicar la producción de diversos mediadores pro-inflamatorios (como citoquinas y quimioquinas), por lo que tanto las células residentes como las reclutadas al sitio de la inyección deben ser expuestas a un entorno inflamatorio en el espacio acotado de la cavidad peritoneal. En contraste, las KC se encuentran expuestas al espacio vascular, en el cual el flujo sanguíneo por el que llegan las partículas de pLL es constante y permite que los mediadores inflamatorios generados localmente puedan ser removidos más fácilmente. Así, mientras en la cavidad peritoneal las células presentes quedan contenidas en un espacio cursando un proceso inflamatorio y en íntimo contacto con una gran cantidad de partículas de la LL, las KC están en un entorno que *a priori* no sería inflamatorio, y en contacto probablemente solo transitorio con los materiales de la LL. En segundo lugar, además de encontrarse en nichos diferentes, las KC y los macrófagos peritoneales cumplen funciones distintas y por lo tanto es esperable que difieran en sus respuestas a estímulos. En efecto, a diferencia del resto de los macrófagos del cuerpo, las KC tienen la capacidad de activar linfocitos T CD4⁺ vírgenes¹²⁹, mientras que el resto de los macrófagos pueden activar en los tejidos a linfocitos T efectoras, pero no vírgenes. Además, las KC son básicamente anti-inflamatorias y tolerogénicas, expresan altos niveles de PD-L1 y responden a endotoxinas en forma anti-inflamatoria^{129,132}, mientras que los macrófagos peritoneales responden de forma pro-inflamatoria a las mismas. Sumado a esto, es posible especular que el receptor o el conjunto de receptores que medie(n) la internalización por los macrófagos de los materiales de la LL condicione(n) el fenotipo de la célula involucrada. En el caso de las KC, Clec4E es el principal receptor involucrado, mientras que aún no se conocen cuáles receptores, si es que alguno, están involucrados en el reconocimiento de la LL por los macrófagos peritoneales. Así, no es sorprendente que las KC y los macrófagos de la cavidad peritoneal respondan de forma diferente a los materiales de la LL.

5.2.5.2 Estudio preliminar del impacto de Clec4F sobre las respuestas inmunes en la equinococosis quística experimental.

Las respuestas inmunes montadas en el hígado tienen efectos a nivel sistémico¹²⁹. En ratones y humanos, las partículas/moléculas que exponen glicanos terminados en Gal o GalNAc son captadas por el hígado con alta selectividad^{191,192}. Se ha visto que la captación de un antígeno modelo acoplado a partículas con GalNAc/GlcNAc por APC hepáticas induce tolerancia específica de antígeno con expansión de linfocitos Treg, anergia y delección clonal de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺¹⁹¹. Dado el potencial del hígado de inducir respuestas tolerogénicas, el direccionamiento observado de los materiales de la LL (sumamente rica en glicanos con extremos terminales de Gal) a este órgano podría conducir a la generación de respuestas inmunes que favorecieran el establecimiento del parásito. El hecho que las KC sean las principales células en captar materiales de la LL liberados durante el crecimiento del parásito en el modelo de infección experimental llevó a estudiar si dicha captación, a través de Clec4F, podría cumplir un papel en las respuestas inmunes desarrolladas en este modelo. Para esto, se analizaron y compararon entre los ratones WT y *Clec4f*^{-/-} infectados la carga parasitaria desarrollada y, en forma preliminar, algunos parámetros de la respuesta inmune local y sistémica y, en el hígado, la expresión de algunos marcadores en KC y LSEC.

5.2.5.2.1 Estudio del papel de Clec4F sobre respuestas a nivel de la FNPH

El estudio de las respuestas detectables en la FNPH, si bien fue muy acotado y preliminar, resultaba de interés, por un lado, porque la captación de los materiales de la LL circulantes estaba dada principalmente por las KC. Por otro lado, desde un punto de vista más general, hasta la fecha no hay reportes en la bibliografía en los que se evalúen los posibles efectos en el hígado de la equinococosis secundaria experimental intraperitoneal. Como se comentó previamente, en el trabajo de Li *et al.* 2019¹⁸¹ se presentó un modelo de infección intrahepática por *E. granulosus*. Este grupo ha estudiado los efectos de la infección sobre los macrófagos hepáticos (KC y macrófagos derivados de monocitos), pero no ha evaluado la interacción de dichas células con los materiales de la LL específicamente¹⁸².

De forma preliminar, se evaluó la expresión de Relm- α y de PD-L1 en las células de la FNPH. Con respecto a la expresión de Relm- α , si bien los datos corresponden solamente a un único experimento a los 7 meses de infección, no se observó inducción de este marcador en las KC por la infección. Datos obtenidos en el modelo de infección intrahepático por *E. granulosus* mostraron que tras la infección en animales WT se induce la expresión de otro marcador M(IL-4), CD206, tanto en las KC como en los macrófagos hepáticos derivados de monocitos¹⁸². Si bien estos son marcadores y modelos de infección diferentes, resulta llamativa la inducción de la expresión de un marcador en un modelo y la ausencia de otro marcador en otro modelo de infección, siendo la diferencia probablemente atribuible a las diferentes localizaciones del parásito. Por otro lado, a pesar de que no se detectó captación de materiales de la LL por las LSEC, en estas células sí pareció aumentar la expresión de Relm- α a causa de la infección, sin distinguirse diferencias entre los genotipos. Tal vez la inducción de este marcador en las LSEC no dependa de la captación de los materiales de la LL, sino del contacto con los mismos, o con otros componentes liberados por el parásito, o bien con mediadores liberados por otras células, incluyendo las KC.

Con respecto a la expresión de PD-L1, la infección indujo la potenciación de la expresión de este marcador en las KC de animales WT, a los 7 y 9 meses de infección (Figura 4.51). Cabe mencionar que en el modelo de infección intrahepática por *E. multilocularis* se detectó un aumento de PD-L1 en el hígado²⁴. Si bien no se determinó el tipo celular involucrado en dicha inducción, ya que se estudió la expresión por PCR cuantitativa de hígado entero, se puede especular que las KC, al ser las células mieloides más abundantes de la FNPH, serían las involucradas en dicho aumento.

Interesantemente, en los animales *Clec4f*^{-/-} no se observó el aumento en la expresión de PD-L1 en KC que sí fue detectado, como se mencionó, en los animales WT infectados. Así, en las KC el patrón de la expresión de PD-L1 en cierta medida se comportó como el de la captación de los materiales de la LL. Es otras palabras, a los 7 meses de infección, las KC captaron materiales de la LL y se potenció en éstas la expresión de PD-L1, siendo ambos fenómenos dependientes de Clec4F. Si bien el panorama observado a los 9 meses

de infección fue similar al observado a los 7 meses, también se observaron tendencias a la potenciación de la expresión de PD-L1 en KC y captación de materiales de la LL por estas células en los animales *Clec4f^{-/-}* infectados, en comparación con animales sin infectar (Figuras 4.51). Esto sugiere que, la captación de los materiales de LL conduce a un aumento en la expresión de PD-L1 en las KC independientemente de si la captación es dependiente o independiente de Clec4F.

Un trabajo reciente demostró la potenciación de la expresión de PD-L1 en KC dependiente de la presentación de antígeno por KC a linfocitos T CD4⁺ específicos¹⁹³. Así, se puede plantear que la potenciación en la expresión de PD-L1 in KC observada en el contexto de la infección por *E. granulosus* podría deberse a que dichas KC presentan antígenos parasitarios a linfocitos T CD4⁺ específicos que ya pasaron por un proceso de activación y expansión clonal (*priming*). En los animales *Clec4f^{-/-}* infectados, en los que (al menos a los 7 meses de infección) la captación de materiales de la LL es mucho menor que en los animales WT, habría menor presentación antigénica por las KC y por lo tanto una menor inducción de PD-L1. La ausencia de detección de aumento de expresión de PD-L1 en KC a las 24 h de la inyección de pLL se debería a que no habría aun respuestas T CD4⁺ específicas con los antígenos presentes en la LL.

En el artículo ya mencionado¹⁹³, se observó que también en las LSEC se potencia la expresión de PD-L1 tras la colaboración con linfocitos T CD4⁺ específicos de antígeno¹⁹³. Los resultados obtenidos en esta Tesis mostraron que las LSEC no captan materiales de la LL en la infección y tampoco se observó potenciación de la expresión de PD-L1 en estas células. Estos resultados apoyarían el planteo de que los antígenos parasitarios son dirigidos a las KC y no a las LSEC en la infección, y que en este contexto las KC presentarían antígenos a células T CD4⁺.

Si bien la secuencia peptídica sin modificaciones post-traduccionales de la principal apomucina predicha de la LL contiene un epítotope T¹⁹⁴, no es claro que el procesamiento intracelular de las mucinas de la LL (fuertemente modificadas post-traduccionalmente) genere estos epítotope⁷⁰. En este contexto, cabe mencionar que la LL tiene una gran capacidad de adsorber proteínas convencionales a través de los depósitos de

InsP₆.Ca^{65,195}. Así, se puede plantear que los materiales de la LL circulantes liberados durante la infección podrían incluir proteínas convencionales del parásito adsorbidas sobre los depósitos de InsP₆.Ca que podrían contribuir a generar epítopes T⁷⁰.

5.2.5.2.2 Estudio del papel de Clec4F sobre las respuestas inmunes locales y sistémicas a la infección por *E. granulosus*

Los resultados obtenidos en la presente Tesis utilizando el modelo de infección experimental intraperitoneal en los animales WT reprodujeron los datos obtenidos previamente por el grupo a nivel de la respuesta inmune local⁸¹. Así, los datos mostraron que, tanto luego de 7 como de 9 meses de infección, la misma induce un aumento en la celularidad de la cavidad peritoneal, siendo los eosinófilos y los macrófagos los tipos celulares estudiados que más contribuyeron a dicho aumento. Además, en los macrófagos, se observó aumento de la expresión de Relm- α en LPM y aumento de PD-L1 tanto en SPM y como en LPM.

Con respecto a las respuestas sistémicas en animales WT, se evaluó solamente la producción *ex vivo* de citoquinas por linfocitos T de bazo, tras re-estimulación específica de antígeno. Los datos obtenidos reprodujeron nuevamente los resultados obtenidos previamente por el grupo, ya que tanto a los 7 como 9 meses de infección, se observaron citoquinas Th2 (IL-5 e IL-13), además de la citoquina reguladora IL-10, pero no se detectaron citoquinas Th1 ni Th17, ni TGF- β (datos no publicados del grupo).

Con respecto al posible papel de Clec4F, la ausencia del receptor no modificó los parámetros de respuesta de células innatas evaluados en el sitio de infección (Figuras 4.46-4.48), así como tampoco la respuesta adaptativa sistémica evaluada en términos de la respuesta T en bazo (Figura 4.49).

Las respuestas a la infección desarrolladas en la cavidad peritoneal van a estar influenciadas tanto por las respuestas innatas iniciadas localmente como por las respuestas adaptativas montadas en forma sistémica, que también condicionan a los mecanismos efectores innatos expresados localmente. *A priori* tiene sentido que Clec4F

no cumpla un papel sobre las respuestas inmunes innatas locales, ya que el receptor no se expresa en las células presentes en la cavidad peritoneal. Así, es de esperar que las respuestas locales a la infección sean iniciadas por el reconocimiento de componentes de la hidátide por otros receptores (incluyendo receptores Fc y de complemento) y/o por la interacción de la LL con las células mieloides a través del mecanismo independiente de receptores, mencionado en la Introducción (MATS)⁷⁰. Por su parte las respuestas adaptativas a la infección tendrán dos componentes principales: la producción de anticuerpos específicos y la activación de linfocitos T CD4⁺ específicos. Estas respuestas adaptativas van a ser influenciadas por la disponibilidad de antígenos parasitarios, necesarios para su activación. Con respecto a esto, los datos obtenidos en la presente Tesis mostraron que los materiales de la LL circulan por el organismo, llegando a órganos linfoides secundarios y al hígado. Como se discutió previamente, si bien no se cuentan con datos de biodistribución de los materiales de la LL en el contexto de la infección en animales WT y *Clec4f*^{-/-}, se puede especular que la misma tendría un patrón similar al de la distribución de pLL. Así, en los animales WT los materiales se concentrarían principalmente en el hígado y secundariamente en órganos linfoides, mientras que en los *Clec4f*^{-/-}, los materiales se concentrarían principalmente en los órganos linfoides, y en particular en lo que parecen ser folículos. Extrapolando a la situación de infección se puede especular que en ratones *Clec4f*^{-/-} se producirían mayores títulos de anticuerpos T-dependientes contra componentes del parásito que en animales WT. En los folículos también se encuentran los LBZM que producen anticuerpos contra antígenos T-independientes, los que presumiblemente sean abundantes en las mucinas de la LL. Por lo tanto, en animales *Clec4f*^{-/-} también se podrían producir mayores títulos de anticuerpos T-independientes contra componentes del parásito que en los animales WT.

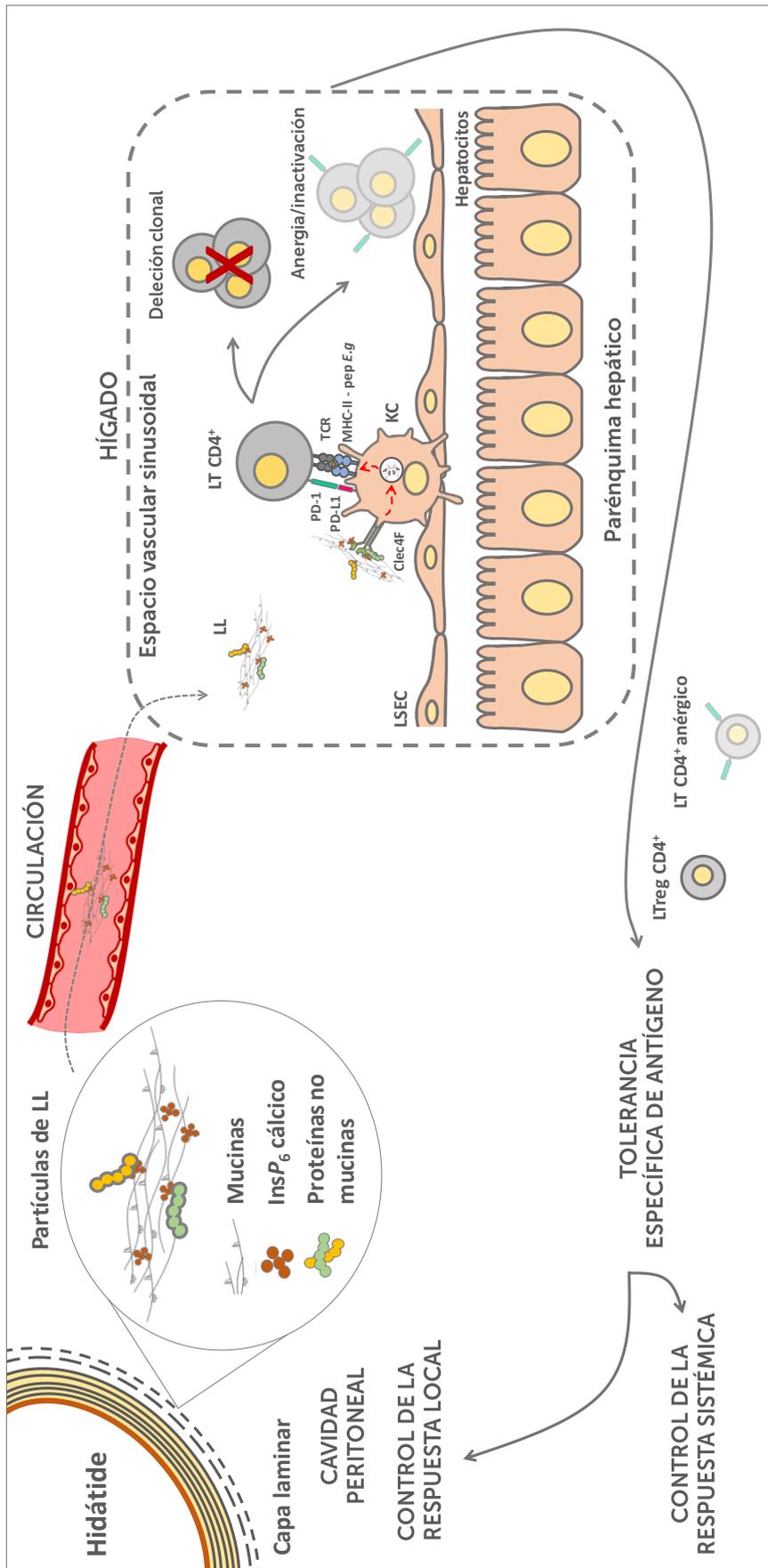
Con respecto a la respuesta T, la distribución diferente de los materiales de la LL entre los genotipos no parece concordar con los resultados observados en cuanto a la activación de linfocitos T CD4⁺ a nivel de bazo, al menos a los tiempos finales estudiados (7 y 9 meses). Por otro lado, en esta Tesis no se evaluó la respuesta T local a la infección. Datos previos del grupo mostraron que los linfocitos T CD4⁺ efectores presentes en la cavidad peritoneal de animales infectados tienen menor capacidad proliferativa que los

linfocitos T de animales control; esta diferencia fue acompañada de una mayor frecuencia de linfocitos T CD4⁺ PD-1⁺ y de linfocitos T_{reg} FoxP₃⁺ en los animales infectados⁸¹. Si bien es posible que la respuesta T local a la infección tenga un comportamiento diferente al de la respuesta T observada en bazo, esto no parece ser lo que está sucediendo, ya que una diferencia entre genotipos en respuesta T local debería verse reflejada en diferencias en reclutamiento de células inflamatorias a la cavidad peritoneal, las cuales no fueron detectadas, al menos a los tiempos finales de estudio (Figura 4.46). En la siguiente sección se discuten posibles explicaciones para las observaciones aparentemente discordantes mencionadas.

5.2.5.2.3 Integración: Posible papel de Clec4F sobre las respuestas inmunes a la infección.

Una observación importante de la presente Tesis fue que, en la infección experimental, tanto de 7 como de 9 meses, hubo una fuerte tendencia, que no alcanzó la significancia estadística, hacia una menor carga parasitaria en los animales *Clec4f*^{-/-} (Figura 4.45). La misma tendencia fue observada en una infección adicional de 7 meses, generada con una dosis mayor de PSC a las usadas en esta Tesis, y por ello no reportada en la misma. En otros sistemas experimentales se ha mostrado que la presentación de antígenos por KC, en condiciones de ausencia de inflamación hepática, es tolerogénica, e induce la expansión de linfocitos Treg FoxP₃⁺ secretores de IL-10, y la inactivación y delección clonal de linfocitos T CD4⁺ específicos en el hígado^{129,132}. Esta tolerogénesis probablemente depende de la expresión de PD-L1 por KC, e influencia a las respuestas inmunes a nivel sistémico^{156,191,193}. Además, el bloqueo de PD-L1 en el modelo de infección hepática por *E. multilocularis* condujo al desarrollo de menores cargas parasitarias, evidenciando así un papel de PD-L1 en el condicionamiento de las respuestas inmunes a la infección¹⁹⁶. Así, se podría plantear que en el contexto de la infección por *E. granulosus*, la captación de materiales de la LL por KC, en forma mayoritariamente dependiente de Clec4F, conduciría a presentación de antígenos por estas células a linfocitos T CD4⁺ específicos. Esta presentación potenciaría, como se postuló antes, la expresión de PD-L1 en KC de animales WT, y la presentación por KC que expresan altos niveles de PD-L1 a su vez promovería el desarrollo de respuestas tolerogénicas contra el parásito. Se podría

plantear entonces, que en los animales WT las respuestas tolerogénicas iniciadas en el hígado actuarían sobre las respuestas inmunes montadas contra el parásito (locales y sistémicas) favoreciendo el crecimiento del mismo, lo que repercutiría en una mayor carga parasitaria (Figura 5.2).



Ver

de la Figura 5.2 en la siguiente página.

leyenda

Figura 5.2. Modelo de inducción de respuestas tolerogénicas en hígado a componentes de la hidátide de *E. granulosus* en la infección. Durante la infección se liberan materiales de la LL que llegan a localizaciones distantes al sitio de infección incluyendo el hígado, donde son captados por las KC, en forma mayoritariamente dependiente de Clec4F. La presentación por KC de antígenos parasitarios asociados a los materiales de la LL a linfocitos T CD4⁺ específicos que previamente pasaron por procesos de activación y amplificación durante la infección permitiría la colaboración de dichos linfocitos para la potenciación de la expresión de PD-L1 en las KC. Dado que, en condiciones de ausencia de inflamación hepática, la presentación por KC es tolerogénica, se inducirían linfocitos Treg, así como la delección y/o inactivación clonal de linfocitos T efectoras. Estas respuestas tolerogénicas tenderían a controlar las respuestas de tipo efector montadas contra el parásito, tanto en el sitio de infección como a nivel sistémico.

Este planteo abarca la posibilidad de que en los animales *Clec4f*^{-/-} infectados, a consecuencia de que una mayor fracción de los materiales de LL circulantes alcance los órganos linfoides y/o que exista menor respuesta Treg en comparación con los animales WT, se produzcan mayores títulos de anticuerpos contra antígenos parasitarios, como se mencionó previamente. Los anticuerpos tienen diversas funciones efectoras que podrían impactar en el crecimiento del parásito, como ser la activación de complemento y la liberación de mediadores tóxicos por eosinófilos, entre otros⁹⁸. Esto enfatiza la relevancia de estudiar la respuesta de anticuerpos producidos a lo largo de la infección contra componentes del parásito en ambos genotipos.

En contraposición con la discusión anterior, los parámetros de respuesta inmune local evaluados en cavidad peritoneal y los de respuesta inmune sistémica medidos no se vieron modificados por la ausencia de Clec4F. Sin embargo, a nivel de hígado se observó una potenciación de la expresión de PD-L1 en las KC que dependió mayoritariamente de Clec4F, correlacionando con lo observado para la captación de materiales de la LL también por estas células, al menos a los 7 meses de infección. A continuación se discuten hipótesis que podrían conciliar los resultados, definitivos y preliminares, obtenidos.

El modelo de infección crónica empleado en esta Tesis abarcó de 7 a 9 meses. Si bien a estos tiempos finales las respuestas evaluadas a nivel de bazo y del sitio de infección no mostraron diferencias entre los genotipos WT y *Clec4f*^{-/-}, no se puede descartar que existan diferencias en estas respuestas a tiempos más tempranos en la infección,

incluyendo la importante etapa alrededor de las dos semanas, cuando comienza a generarse la LL⁸⁰. Se podría plantear incluso que, durante las primeras etapas de la infección, cuando los materiales de la LL circulantes son menos abundantes porque las hidátides son más pequeñas, la totalidad de la captación celular de estos materiales en ratones WT sería dependiente de Clec4F. Sin ser contradictorio con lo anterior, también se puede plantear, en el modelo de infección secundaria, el direccionamiento a KC a través de Clec4F de antígenos del glicocáliz de los PSC, que contienen el trisacárido P1, reconocido por Clec4F⁴⁰.

Las posibilidades anteriores implicarían, en una visión simplificada, que en los animales WT los antígenos del parásito que dejan el sitio de infección serían captados por las KC solamente, mientras que en los animales *Clec4f*^{-/-} dichos materiales se localizarían en órganos linfoides secundarios. Así, en los animales WT, a tiempos tempranos de infección, se vería favorecida la inducción de respuestas tolerogénicas, y esto ocurriría en forma más débil en los animales *Clec4f*^{-/-}. Luego, a medida que las hidátides crecen, aumentaría la disponibilidad de materiales de la LL, haciendo que éstos, además de ser captados por las KC, llegaran a sitios en los que el *priming* contra antígenos parasitarios sí sería inmunogénico, aún en los animales WT. En esta situación las dos respuestas, tolerogénica en hígado e inmunogénica en órganos linfoides, estarían contribuyendo a las respuestas inmunes a la infección detectadas.

Por otro lado, la captación de materiales de la LL por KC y la potenciación de la expresión de PD-L1 en estas células en animales *Clec4f*^{-/-} al tiempo más largo de infección estudiado (9 meses) sugieren un posible papel de las KC en la presentación de antígeno tolerogénica que sería independiente del receptor involucrado en la captación de los antígenos. En esta hipótesis, mientras que a tiempos tempranos de infección, la captación por KC e inducción de tolerancia a antígenos del parásito sería más eficiente en ratones WT que en *Clec4f*^{-/-}, a tiempos largos de infección una creciente captación de materiales de LL por KC independiente de Clec4F igualaría las respuestas inmunes entre los genotipos.

Los dos tipos de planteo anteriores pueden contribuir a explicar por qué las respuestas locales y sistémicas no parecen diferir entre los genotipos WT y *Clec4f*^{-/-} a los tiempos de infección analizados. Sería relevante evaluar las respuestas T CD4⁺ montadas contra el parásito a nivel sistémico, locales, y en hígado a lo largo de la infección en ambos genotipos.

Finalmente, no se puede descartar que, las respuestas inmunes tolerogénicas montadas en el hígado, de existir, no condicionen a las respuestas inmunes presentes en el sitio de infección y sistémicas, sino que estas últimas dependan enteramente de procesos efectores locales y en los ganglios drenantes del sitio de infección. En este sentido, cobraría relevancia la interacción de las células innatas presentes en el sitio de infección con la hidátide, incluyendo componentes parasitarios adicionales a la LL, que podrían tener propiedades inmunomoduladoras, y así regular negativamente las respuestas del hospedero a la infección^{87,197}.

5.2.5.3 Clec4F en infecciones naturales por *E. granulosus*

Ancestralmente, los estadios larvarios de los parásitos pertenecientes a la familia de los ténidos (incluidos los del género *Echinococcus*) infectaban el hígado de los roedores^{70,157}. En este contexto, se podría postular que la interacción de los materiales desprendidos por los parásitos con un receptor (Clec4F) expresado específicamente por las células fagocíticas que resultan ser las más abundantes del organismo (KC), presentes en el mismo órgano (hígado), podría haber sido ventajosa evolutivamente. Así, la remoción de los materiales de la LL por las KC habría evitado la acumulación de partículas y la consiguiente inflamación en los sinusoides hepáticos y/o en otros sitios y/o dando lugar a presentación de antígeno tolerogénica (por KC) en lugar de inmunogénica (por APC convencionales).

Los hospederos naturales de las larvas de *E. granulosus s.l.* son en su mayoría ungulados, incluidos ovejas, vacas, cerdos, cabras, camellos y caballos. Al igual que en los roedores, en estos animales Clec4F también parece expresarse en el hígado¹¹⁶. Por lo tanto, la captación de materiales LL por parte de las KC a través de Clec4F probablemente

también se produce en dichos hospederos. Sin embargo, en los mismos, Clec4F parece expresarse adicionalmente en órganos linfoides secundarios¹¹⁶, abriendo la posibilidad de que fagocitos no KC, quizás anatómicamente más ampliamente distribuidos, puedan actuar como sumideros adicionales para materiales de la LL. Si bien la equinocosis quística en ungulados es causada principalmente por *E. granulosus s.s.*, también es causada por *E. ortleppi*, *E. canadensis* y *E. equinus*²⁷. El motivo sanguíneo P1 presente en la LL de *E. granulosus s.s.*, reconocido por Clec4F (Figura 4.7), probablemente se exprese en la LL de todas las especies de *E. granulosus s.l.*, ya que es abundante en la LL de *E. multilocularis*, más distante evolutivamente⁵⁶. Por lo tanto, aunque los datos obtenidos en la presente Tesis corresponden solo a *E. granulosus s.s.*, es muy probable que Clec4F sea relevante para la equinocosis quística en ungulados independientemente de la especie infectante dentro del grupo *E. granulosus s.l.*

Como se mencionó en la Introducción, los humanos no expresan Clec4F con un dominio lectina funcional¹¹⁶. Por otro lado, estos hospederos normalmente son un callejón sin salida para el ciclo de vida de este parásito, lo que significa que la infección por *Echinococcus* en humanos no ha sido optimizada a través de la evolución. Por su parte, la infección en humanos por *E. multilocularis* suele estar acompañada de una fuerte inflamación local (con destrucción de tejidos), lo que no es el caso para la infección por *E. granulosus*^{39,195}. Se podría plantear que para *E. granulosus*, que crece más lentamente que *E. multilocularis*, los mecanismos de eliminación de desechos de la LL independientes de Clec4F serían, en la mayoría de los casos, suficientes para evitar una excesiva acumulación de dichos desechos de la LL. Esto no sería así para *E. multilocularis*, ya que la ausencia de Clec4F promovería la acumulación de materiales de la LL, con la consecuente inflamación asociada. Se podría postular que en los humanos tales mecanismos independientes de Clec4F incluirían la captación a través de lectinas expresadas en KC con especificidades relacionadas con Clec4F, como MGL y/o ASGR, así como por receptores de complemento y receptores Fc. Sería relevante evaluar entonces, la captación por las células del hígado de los materiales de la LL en el contexto de la infección por *E. granulosus* y *E. multilocularis* en humanos.

6 Conclusiones

En la presente Tesis se demostró, tanto tras la inyección de materiales de la LL exógenos como en el modelo de infección intraperitoneal secundaria en ratón, que las mucinas de la LL llegan a la circulación y son captadas selectivamente por las KC en el hígado, en forma dependiente de la integridad de dichas mucinas y mayoritariamente dependiente de Clec4F. Además, se evidenció captación de los materiales de la LL en forma independiente de Clec4F, tanto en las KC como en otros tipos celulares hepáticos (hepatocitos, LSEC y células CD11b⁺ no KC), así como en órganos linfoides secundarios, y en el sitio de inyección/infección (cavidad peritoneal). El estudio de los mecanismos de captación de los materiales de la LL en forma independiente de Clec4F es relevante a la hora de extrapolar lo que podría suceder en las infecciones en los hospederos naturales, en particular en el humano, que carece de Clec4F.

Por otro lado, si bien los resultados obtenidos son fragmentarios, los mismos sugieren que, en el contexto de la infección experimental, el direccionamiento de antígenos parasitarios asociados a los materiales de la LL a las KC permitiría la colaboración con linfocitos T CD4⁺ específicos para la potenciación de la expresión de PD-L1 en las KC y la inducción de respuestas tolerogénicas contra el parásito. Esto a su vez favorecería el establecimiento y/o crecimiento del parásito. Estos procesos serían favorecidos por Clec4F, pero en ausencia del receptor habría mecanismos compensatorios que llevarían a similares resultados.

7 Bibliografía

1. Wright, J. E., Werkman, M., Dunn, J. & Anderson, R. Current epidemiological evidence for predisposition to high or low intensity human helminth infection: a systematic review. *Parasites & Vectors* 11, (2018).
2. Coakley, G. & Harris, N. L. Interactions between macrophages and helminths. *Parasite Immunology* 42, (2020).
3. Maizels, R. M. & Gause, W. C. Targeting helminths: The expanding world of type 2 immune effector mechanisms. *Journal of Experimental Medicine* 220, (2023).
4. Lekki-Jóźwiak, J. & Bąska, P. The Roles of Various Immune Cell Populations in Immune Response against Helminths. *Int. J. Mol. Sci.* 25, (2024).
5. Gazzinelli-Guimaraes, P. & Nutman, T. Helminth parasites and immune regulation. *F1000 Research* (2018).
6. Bohnacker, S., Troisi, F., de los Reyes Jiménez, M. & Esser-von Bieren, J. What Can Parasites Tell Us About the Pathogenesis and Treatment of Asthma and Allergic Diseases. *Front. Immunol.* 11, (2020).
7. Herbert, D. R. *et al.* Intestinal epithelial cell secretion of RELM- β protects against gastrointestinal worm infection. *The Journal of Experimental Medicine* 206, (2009).
8. Licona-Limón, P. *et al.* Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. *Immunity* 39, 744–757 (2013).
9. Huang, L. & Appleton, J. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. *Trends in Parasitology* 32, 798–807 (2016).
10. Rosenberg, H. F., Dyer, K. & Foster, P. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 13, (2013).
11. Nausch, N. & Mutapi, F. Group 2 ILCs: A way of enhancing immune protection against human helminths? *Parasite Immunology* 40, (2017).
12. Jenkins, S. J. *et al.* Local Macrophage Proliferation, Rather than Recruitment from the Blood, Is a Signature of TH2 Inflammation. *Science* 332, 1284–1288 (2011).
13. Locati, M., Curtale, G. & Mantovani, A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 15, 123–147 (2020).
14. Rodriguez, P., C., Zea A. H., DeSalvo J., Culotta K., Zabaleta J., Quiceno D., Ochoa J., Ochoa A.L-Arginine Consumption by Macrophages Modulates the Expression of CD3 Chain in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 171, 1232–1239 (2003).

15. Cao, S., Gong, W., Zhang, X., Xu, M., Wang, Y., Xu, Y., Cao, J., Shen, Y., Chen, J. Arginase promotes immune evasion of *Echinococcus granulosus* in mice. *Parasites & Vectors* 13, (2020).
16. Bieren, J. E. *et al.* Antibodies Trap Tissue Migrating Helminth Larvae and Prevent Tissue Damage by Driving IL-4Ra-Independent Alternative Differentiation of Macrophages. *PLoS Pathogens* 9, (2013).
17. Doolan, R. & Bouchery, T. Hookworm infections: Reappraising the evidence for a role of neutrophils in light of NETosis. *Parasite Immunology* 44, (2022).
18. Bouchery, T. *et al.* Hookworms Evade Host Immunity by Secreting a Deoxyribonuclease to Degrade Neutrophil Extracellular Traps. *Cell Host & Microbe* 27, 277-289.e6 (2020).
19. Chen, F., Wu, W., Millman, A., Craft, J., Chen, E., Nirav, P., Boucher, J., Urban, J., Kim, C., Gause, W. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nature immunology* (2014).
20. Logan, J., Navarro, S., Loukas, A. & Giacomin, P. Helminth-induced regulatory T cells and suppression of allergic responses. *Current Opinion in Immunology* 54, (2018).
21. White, M. P. J., McManus, C. M. & Maizels, R. M. Regulatory T-cells in helminth infection: induction, function and therapeutic potential. *Immunology* 160, (2020).
22. Terrazas, L. I., Montero, D., Terrazas, C. A., Reyes, J. L. & Rodríguez-Sosa, M. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *International Journal for Parasitology* (2005).
23. Stempin, C. C., Motrán, C., Aoki, M., Falcón, C., Cerbán, M., Cervi, L. PD-L2 negatively regulates Th1-mediated immunopathology during *Fasciola hepatica* infection. *Oncotarget* 7, (2016)
24. La, X., Zhang, F., Li, Y., Guo, Y., Zhao, H., Pang, N., Ma, X., Wen, C., Fan, H., Ding, J. Upregulation of PD-1 on CD4⁺CD25⁺T cells is associated with immunosuppression in liver of mice infected with *Echinococcus multilocularis*. *International Immunopharmacology* 26, (2015).
25. Yazdanbakhsh, M. & Matricardi, P. M. Parasites and the hygiene hypothesis. *Clinic Rev Allerg Immunol* 26, 15–23 (2004).
26. Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T., Ito, A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology* 43, (2013).
27. Cucher, M. A. & Macchiaroli, N. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts. *Tropical Medicine and International Health* 21, (2015).

28. Moro, P. & Schantz, P. M. Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases* 13, 125–133 (2009).
29. Agudelo Higueta, N. I., Brunetti, E. & McCloskey, C. Cystic Echinococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* 54, 518–523 (2016).
30. Casulli, A., Massolo, A., Urmas, S., Umhang, G., Santolamazza, F., Santoro, A.,. Species and genotypes belonging to *Echinococcus granulosus sensu lato* complex causing human cystic echinococcosis in Europe (2000–2021): a systematic review. *Parasites & Vectors* 15, 109 (2022).
31. Alvarez Rojas, C. A., Romig, T. & Lightowlers, M. W. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans – review of current knowledge. *International Journal for Parasitology* 44, 9–18 (2014).
32. Cardona, G. A. & Carmena, D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Veterinary Parasitology* 192, 10–32 (2013).
33. Thompson, R. C. A. Biology and Systematics of *Echinococcus*. in *Advances in Parasitology* (eds. Thompson, R. C. A., Deplazes, P. & Lymbery, A. J.) vol. 95 65–109 (Academic Press, 2017).
34. Thompson, R. C. A., Lymbery, A. J. & Constantine, C. C. Variation in *Echinococcus*: Towards a Taxonomic Revision of the Genus. in *Advances in Parasitology* (eds. Baker, J. R., Muller, R. & Rollinson, D.) vol. 35 145–175 (Academic Press, 1995).
35. Díaz, Á. Immunology of cystic echinococcosis (hydatid disease). *British Medical Bulletin* 124, (2017).
36. Gottstein, B. *et al.* Chapter One - Immunology of Alveolar and Cystic Echinococcosis (AE and CE). in *Advances in Parasitology* (eds. Thompson, R. C. A., Deplazes, P. & Lymbery, A. J.) vol. 96 1–54 (Academic Press, 2017).
37. McSorley, H. J. & Maizels, R. M. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clinical Microbiology Reviews* 25, (2012).
38. Bortoletti, G. & Ferretti, G. Ultrastructural aspects of fertile and sterile cysts of *Echinococcus granulosus* developed in hosts of different species. *International Journal for Parasitology* 8, 421-431 (1978)
39. Díaz, Á., Sagasti, C. & Casaravilla, C. Granulomatous responses in larval taeniid infections. *Parasite Immunology* 40, e12523 (2018).
40. Díaz, A. Casaravilla, C., Irigoín, F., Lin, G., Previato, J., Ferreira, F. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends in Parasitology* 27, 204–213 (2011).

41. Ingold, K., Gottstein, B. & Hemphill, A. High molecular mass glycans are major structural elements associated with the laminated layer of in vitro cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Int J Parasitol* 30, 207–214 (2000).
42. Reinehr, M., Micheloud, C., Grimm, F., Kronenberg, P., Grimm, J., Beck, A., Nell, J., Schwabedissen C., Furrer, E., Mullhaupt, B., Barth, T., Deplazes, P., Weber, A. Pathology of Echinococcosis: A Morphologic and Immunohistochemical Study on 138 Specimens With Focus on the Differential Diagnosis Between Cystic and Alveolar Echinococcosis. *The American Journal of Surgical Pathology* 44, 43 (2020).
43. Díaz, Á., Fernández, C., Pittini, A., Seoane, P., Judith E., Casaravilla, C. The laminated layer: Recent advances and insights into *Echinococcus* biology and evolution. *Experimental Parasitology* 158, (2015).
44. Thornton, D. J., Sharpe, C. & Ridley, C. Intracellular Processing of Human Secreted Polymeric Airway Mucins. *Annals ATS* 15, S154–S158 (2018).
45. Casaravilla, C. Díaz, A. Studies on the structural mucins of the *Echinococcus granulosus* laminated layer. *Molecular and Biochemical Parasitology* 174, (2010).
46. Parkinson, J. Wasmuth, J., Salinas, G., Bizarro, C., Sanford, C., Berriman, M., Ferreira, H., Zaha, A., Blaxter, M., Maizels R., Fernández, C.. A Transcriptomic Analysis of *Echinococcus granulosus* Larval Stages: Implications for Parasite Biology and Host Adaptation. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6, (2012).
47. Tsai, I. *et al.* “The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism,” *Nature*, 496, 7443, 57–63 (2013).
48. Zheng, H. *et al.* The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet* 45, 1168–1175 (2013).
49. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Edition (NY), (2009).
50. Kilejian, A. & Schwabe, C. W. Studies on the polysaccharides of the *Echinococcus granulosus* cyst, with observations on a possible mechanism for laminated membrane formation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 40, 25–36 (1971).
51. Korc, I., Hierro, J., Lasalvia, E., Falco, M. & Calcagno, M. Chemical characterization of the polysaccharide of the hydatid membrane of *Echinococcus granulosus*. *Experimental Parasitology* 20, 219–224 (1967).
52. Lin, G., Todeschini, A., Koizumi, A., Neves, J., González, H., Dematteis, S., Hada, N., Previato, J., Ferreira, F., Mendoca-Previato, L., Díaz, A.. Further structural characterization of the *Echinococcus granulosus* laminated layer carbohydrates: The blood-antigen P1-motif gives rise to branches at different points of the O-glycan chains. *Glycobiology* 23, 438–452 (2013).

53. Russi, S., Siracusano, A. & Vicari, G. Isolation and characterization of a blood P1 active carbohydrate antigen of *Echinococcus granulosus* cyst membrane. *Journal of Immunology* 112, (1974).
54. Hülsmeier, A. J., Gehrig, P., Geyer, R., Sack, R., Gottstein, B., Deplazes, P., Kohler, P.. A Major *Echinococcus multilocularis* Antigen Is a Mucin-type Glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 277, 5742–5748 (2002).
55. Hülsmeier, A. J., Deplazes, P., Naem, S., Nonaka, N., Henet, T., Kohler, P... An *Echinococcus multilocularis* coproantigen is a surface glycoprotein with unique O-glycosylation. *Glycobiology* 20, 127–135 (2010).
56. del Puerto, L., Rovetta, R., Navata, M., Fontana, C., Lin, G., Moyna, G., Dematteis, S., Brehm, K., Koziol, U., Ferreira, F., Díaz, A.. Negligible elongation of mucin glycans with Gal b1-3 units distinguishes the laminated layer of *Echinococcus multilocularis* from that of *Echinococcus granulosus*. *International Journal for Parasitology* 46, 311–321 (2016).
57. Díaz, Á. Fontana, C., Todeschini, A., Soulé, S., González H., Casaravilla, C., Portela, M., Mohana-Borges, R., Mendoca-Previato, L., Previato, J., Ferreira, F. *et al.* The Major Surface Carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* Cyst: Mucin-Type O-Glycans Decorated by Novel Galactose-Based Structures. *Biochemistry* 48, (2009).
58. Szrergold, S., Graham, R. A. & Brown, T. R. Observation of inositol pentakis- hexakisphosphates in mammalian tissues by NMR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 149, (1987).
59. Pittet, D., Lew, D., Mayr, G., Monod, A. & Schlegel, W. Chemoattractant Receptor Promotion of Ca²⁺ Influx across the Plasma Membrane of HL-60 Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 7251–7261 (1989).
60. Torres, J. *et al.* Solution behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic/nuclear conditions. *Journal of Inorganic Biochemistry* (2005).
61. Veiga, N., Torres, J., Domínguez, S., Mederos, A., Irvine, R., Díaz, A., Kremer, C. The behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of magnesium(II) and calcium(II): Protein-free soluble InsP6 is limited to 49 IM under cytosolic/nuclear conditions. *Journal of Inorganic Biochemistry* (2006).
62. Lapan, E. A. Magnesium inositol hexaphosphate deposits in mesozoan dispersal larve. *Experimental Cell Research* 94, 277–282 (1975).
63. Shears, S. B. Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cellular Signalling* 13, (2001).

64. Tsui, M. M. & York, J. D. Roles of inositol phosphates and inositol pyrophosphates in development, cell signaling and nuclear processes. *Adv. Enzyme Regul.* 50 (2012).
65. Casaravilla, C., Brearley, C., Soulé, S., Fontana, C., Veiga, N., Bessio, M., Ferreira, F., Kremer, C., Díaz, A.. Characterization of myo-inositol hexakisphosphate deposits from larval *Echinococcus granulosus*. *FEBS Journal* 273, (2006).
66. Irigoin, F., Casaravilla, C., Iborra, I., Sim, R., Ferreira F., Díaz A. Unique precipitation and exocytosis of a calcium salt of myo-inositol hexakisphosphate in larval *Echinococcus granulosus*. *Journal of Cellular Biochemistry* 1272–1281 (2004).
67. Folkmann, A. W. Insights into mRNA export-linked molecular mechanisms of human disease through a Gle1 structure-function analysis. *Advances in Biological Regulation* (2014).
68. Wilson, M. S. C., Livermore, T. M. & Saiardi, A. Inositol pyrophosphates: between signalling and metabolism. *Biochem J.* 452, (2013).
69. Barrios, A. A. *et al.* Inefficient and abortive classical complement pathway activation by the calcium inositol hexakisphosphate component of the *Echinococcus granulosus* laminated layer. *Immunobiology* 224, 710–719 (2019).
70. Díaz, Á. Barrios, A. A., Grezzi, L., Mouhape, C., Jenkins, S., Judith, A., Casaravilla, C.. Immunology of a unique biological structure: the *Echinococcus* laminated layer. *Protein & Cell.* 14, (2023)
71. Coltorti, E. A. & Varela-Díaz, V. M. Penetration of host IgG molecules into hydatid cysts. *Parasitology Research* 48, (1975)
72. Varela-Díaz, V. M. & Coltorti, E. A. The Presence of Host Immunoglobulins in Hydatid Cyst Membranes. *The Journal of Parasitology* 59, 484–488 (1973).
73. Taherkhani, H., Zeyhle, E. & Rogan, M. T. Antibody responses in human cystic hydatid disease to the laminated layer of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res* 101, 647–652 (2007).
74. Riesle, S. *et al.* Bovine IgG subclasses and fertility of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. *Veterinary Parasitology* 205, 125–133 (2014).
75. Gottstein, B., Wunderlin, E. & Tanner, I. *Echinococcus multilocularis*: parasite-specific humoral and cellular immune response subsets in mouse strains susceptible (AKR, C57Bl/6J) or 'resistant' (C57Bl/10) to secondary alveolar echinococcosis. *Clinical and Experimental Immunology* 96, 245–252 (1994).
76. Dai, W. J., Hemphill, A., Waldvogel, A., Ingold, K., Deplazes, P., Mossman, H., Gottstein, B.. Major Carbohydrate Antigen of *Echinococcus multilocularis* Induces an Immunoglobulin G Response Independent of $\alpha\beta$ + CD4+ T Cells. *Infection and Immunity* 69, 6074–6083 (2001).
77. Walker, M., Baz, A., Dematteis, S., Stettler, M., Gottstein, B., Schaller, J., Hemphill, A.. Isolation and Characterization of a Secretory Component of *Echinococcus multilocularis*

- Metacestodes Potentially Involved in Modulating the Host-Parasite Interface. *Infection and Immunity* 72, 527–536 (2004).
78. Hada, N., Morita, T., Ueda, T., Masuda, K., Nakane, H., Ogane, M., Yamano, K., Schweizer, F., Kiuchi, F.. Synthesis of the Carbohydrate Moiety of Glycoproteins from the Parasite *Echinococcus granulosus* and Their Antigenicity against Human Sera. *Molecules* 26, 5652 (2021).
79. Sakamoto, T. & Cabrera, P. A. Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle. *Acta Tropica* 85, 271–279 (2003).
80. Díaz, A., Casaravilla, C., Allen, J. E., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology. 27, (2011).
81. 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. *Infection and Immunity* 92, e00276-23 (2024).
82. Breijo, M., Spinelli, P., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. *Echinococcus granulosus*: An Intraperitoneal Diffusion Chamber Model of Secondary Infection in Mice. *Exp. Parasitol.* 90, (1998).
83. Richards, K. S., Arme, C. & Bridges, J. F. *Echinococcus granulosus equinus*: an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cysts. *Parasitology* 86, 407–417 (1983).
84. Rogan, M. T. & Craig, P. S. Immunology of *Echinococcus granulosus* infections. *Acta Tropica* 67, 7–17 (1997).
85. Rogan, M. T., Bodell, A. J. & Craig, P. S. Post-encystment/established immunity in cystic echinococcosis: is it really that simple? *Parasite Immunology* 37, 1–9 (2015).
86. Dyck, L. & Mills, K. H. G. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *European Journal of Immunology* 47, 765–779 (2017).
87. Díaz, A., Casaravilla, C., Barrios, A. A., Ferreira, A. M.. Parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis. *Parasite Immunology* 38, (2015).
88. Fratini, F., Tamarozzi, F., Macchia, G., Bertuccini, L., Mariconti, M., Birago, C., Brunetti, E., Cretu, C., Akhan, O., Siles-Lucas, M., Díaz, A., Casulli, A.. Proteomic analysis of plasma exosomes from Cystic Echinococcosis patients provides in vivo support for distinct immune response profiles in active vs inactive infection and suggests potential biomarkers. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14, (2020).
89. Yin, S., Chen, X., Xu, F., Fang, H., Zhang, X., Wu, X., Chen, X.. The effect of *Echinococcus granulosus* on spleen cells and TGF- β expression in the peripheral blood of BALB/c mice. *Parasite Immunology* 39, (2017).

90. Siles-Lucas, M., Casulli, A., Conraths, F. J. & Müller, N. Laboratory Diagnosis of *Echinococcus* spp. in Human Patients and Infected Animals. in *Advances in Parasitology* 96 159–257 (2017).
91. Grimm, J. *et al.* Immunohistological detection of small particles of *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* in lymph nodes is associated with enlarged lymph nodes in alveolar and cystic echinococcosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14, 2020
92. Barth, T. F. E. *et al.* Sensitive and Specific Immunohistochemical Diagnosis of Human Alveolar Echinococcosis with the Monoclonal Antibody Em2G1. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6, (2012).
93. Casaravilla, C., Pittini, A., Dominik, Ruckerl, D., Seoane, P., Jenkins, S., McDonalds, A., Ferreira, A. M., Allen, J., Díaz, A.. Unconventional Maturation of Dendritic Cells Induced by Particles from the Laminated Layer of Larval *Echinococcus granulosus*. *Infection and Immunity* 82, (2014).
94. Ruckerl, D. & Allen, J. E. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. *Immunol Rev* 262, 113–133 (2014).
95. Seoane, P. I., Ruckerl, D., Casaravilla, C., Barrios, A. A., Pittini, A., McDonald, A., Allen, J., Díaz A. Particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer inhibit IL-4 and growth factor-driven Akt phosphorylation and proliferative responses in macrophages. *Scientific Reports*. 14, (2016)
96. Shi, Y. To forge a solid immune recognition. *Protein Cell* 3, 564–570 (2012).
97. Mu, L. *et al.* A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate redistribution-based sensing mechanism initiates a phagocytosis programming. *Nat Commun* 9, 4259 (2018).
98. Ferreira, A. M., Breijo, M., Sim, R. B. & Nieto, A. Contribution of C5-mediated mechanisms to host defence against *Echinococcus granulosus* hydatid infection. *Parasite Immunology* 22, 445–453 (2000).
99. Díaz, A., Ferreira, A. & Sim, R. B. Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *The Journal of Immunology* 158, 3779–3786 (1997).
100. Irigoín, F., Laich, A., Ferreira, A. M., Fernández, C., Sim, R., Díaz, A.. Resistance of the *Echinococcus granulosus* cyst wall to complement activation: analysis of the role of Ins P₆ deposits. *Parasite Immunology* 30, 354–364 (2008).
101. Garlatti, V. *et al.* Cutting Edge: C1q Binds Deoxyribose and Heparan Sulfate through Neighboring Sites of Its Recognition Domain. *The Journal of Immunology* 185, 808–812 (2010).
102. Soufli, I., Toumi, R., Rafa, H., Amri, M., Labsi, M. Khelifi, L., Nicoletti, F., Touil-Boukoffa, C.. Crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* cyst attenuates

- mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice. *J. Inflamm. (Lond)* 17 (2015).
103. Turhan, N, esendagli, G., Ozkayar, O., Tunali, G., Sokmensuer, C., Abbasoglu, O.. Co-existence of chincoccus granulosus infection and cancer metastasis in the liver correlates with reduced Th1 immune responses. *Parasite Immunology* 37, 16–22 (2015).
104. Pittini, Á., Martínez, Y., Casaravilla, C., Seoane, P., Ruckerl, D., Quijano, C., Allen, J. Díaz, A.. Particles from the Echinococcus granulosus Laminated Layer Inhibit CD40 Upregulation in Dendritic Cells by Interfering with Akt Activation. *Infection and Immunity* 87, (2019).
105. Hsu, T. L., lin, G., Koizumi, A., Brehm, K., Hada, N., Chuang, P., Wong, C., Hsie, S., Díaz, A.. The surface carbohydrates of the Echinococcus granulosus larva interact selectively with the rodent Kupffer cell receptor. *Mol. Biochem Parasitol.* 19, (2013).
106. Reis E Sousa, C., Yamasaki, S. & Brown, G. D. Myeloid C-type lectin receptors in innate immune recognition. *Immunity* 57, 700–717 (2024).
107. Zelensky, A. N. & Gready, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal* 272, (2005).
108. Brown, G. D., Willment, J. A. & Whitehead, L. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 18, 374–389 (2018).
109. Del Fresno, C., Iborra, S., Saz-Leal, P., Martínez-López, M. & Sancho, D. Flexible Signaling of Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Inflammation. *Front. Immunol.* 9, 804 (2018).
110. Lehrmans, M. A. & Hill, R. Purification of a fucose-binding lectin from rat liver. *Methods Enzymol.* 98, (1983)
111. Lehrman, M. A. The binding of fucose-containing glycoproteins by hepatic lectins. The binding specificity of the rat liver fucose lectin. *J. Biol Chem.* 261, (1986)
112. Haltiwanger, R. S. The distribution and localization of the fucose-binding lectin in rat tissues and the identification of a high affinity form of the mannose/N-acetylglucosamine-binding lectin in rat liver. *J. Biol. Chem.* 261, (1986)
113. Scott, C. L., *et al.* Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nature Communications.* 7, (2016)
114. Lynch, R. W. Hawley, C., Pellicoro, A., Bain, C., Iredale, J., Jenkins, S.. An efficient method to isolate Kupffer cells eliminating endothelial cell contamination and selective bias. *J Leukoc Biol.* 104, (2018)
115. Guilliams, M., Scott, C.. Liver macrophages in health and disease. *Immunity* 55, (2022)

116. Taylor, M. E., Snelling, T., Smith, D. F. & Drickamer, K. Absence of a human ortholog of rodent Kupffer cell galactose-binding receptor encoded by the CLEC4f gene. *Glycobiology* 29, (2019)
117. Fadden, A. J., Holt, O. J. & Drickamer, K. Molecular characterization of the rat Kupffer cell glycoprotein receptor. *Glycobiology* 13, (2003)
118. Ouyang, Z. *et al.* Trimeric structure of the mouse Kupffer cell C-type lectin receptor Clec4f. *FEBS Lett.* 592, (2019)
119. Coombs, P. J., Taylor, M. E. & Drickamer, K. Two categories of mammalian galactose-binding receptors distinguished by glycan array profiling. *Glycobiology* 16, (2006).
120. Dambuja, I. M. Brown, G.. C-type lectins in immunity: recent developments. *Current Opinion in Immunology* 32, (2015).
121. Graham, L. M. & Brown, G. D. The Dectin-2 family of C-type lectins in immunity and homeostasis. *Cytokine* 48, (2009).
122. Graham, L. M. *et al.* The C-type Lectin Receptor CLECSF8 (CLEC4D) is Expressed by Myeloid Cells and Triggers Cellular Activation through Syk Kinase. *J Biol Chem.* 287, (2012).
123. Li, Y. *et al.* Sialylation on O-glycans protects platelets from clearance by liver Kupffer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, (2017)
124. Jiang, Y., *et al.* Kupffer cell receptor CLEC4F is important for the destruction of desialylated platelets in mice. *Cell Death Differ.* 28, (2021)
125. Singh, S. K., Streng-Ouwehand, I., Litjens, M., Weelij, D., García-Vallejo, J., van Vliet, S., Sealand, E., Kooyk, Y.. Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: Distinct glycan specificities and tumor binding properties. *Molecular Immunology* 46, (2009).
126. Deppermann, C., Kratoofil, R. M., Peiseler, M., David, B. A. & Zindel, J. Macrophage galactose lectin is critical for Kupffer cells to clear aged platelets. *JExp Med.* 217, (2020)
127. Yang, C.Y. *et al.* CLEC4F Is an Inducible C-Type Lectin in F4/80-Positive Cells and Is Involved in Alpha-Galactosylceramide Presentation in Liver. *PLOS ONE* 8, (2013).
128. Robinson, M. W., Harmon, C., O'Farrelly, C.. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Molecular Immunology* 13, (2016)
129. Horst, A. K., Neumann, K., Diehl, L., Tiegs, G.. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cellular & Molecular Immunology* 13, (2016)
130. Kubes, P. & Jenne, C. Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol.* 26, (2018).
131. Zhou, J. Y. Innate immunity and early liver inflammation. *Frontiers in Immunology.* 14, (2023)

132. Thomson, A. W. & Knolle, P.. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol.* 10, (2010).
133. Shetty, S., Lalor, P., Adams, D.. Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 15, (2018)
134. Warren, A., Le Couteur, D., Frase, R., Bowen, D., McCaughan, W., Bertolino, P.. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 44, 1182–1190 (2006).
135. Schulz, C. *et al.* A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science* 336, 86–90 (2012).
136. Bhandari, S., Larsen, A. K., McCourt, P., Smedsrød, B. & Sørensen, K. K. The Scavenger Function of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Health and Disease. *Front. Physiol.* 12, (2021).
137. Wang, J. *et al.* Liver macrophages and sinusoidal endothelial cells execute vaccine-elicited capture of invasive bacteria. *Science Translational Medicine* 15, eade0054 (2023).
138. Terpstra, V. & Berke, T.. Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood* 95, (2000).
139. Shi, J., Gilbert, G. E., Kokubo, Y. & Ohashi, T. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood* 98, (2001).
140. Musrati, M. A., Baetselier, P. D., Movahedi, K. & Ginderachter, J. A. V. Ontogeny, functions and reprogramming of Kupffer cells upon infectious disease. *Frontiers in Immunology* 25, (2023)
141. Helmy, K. Y. *et al.* CRIg: A Macrophage Complement Receptor Required for Phagocytosis of Circulating Pathogens. *Cell* 124, 915–927 (2006).
142. Parker, G. A. & Picut, C. A. Liver Immunology. *Toxicologic Pathology* 33, (2005).
143. Sørensen, K. K., Simon-Santamaria, J., McCuskey, R. S. & Smedsrød, B. Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Comprehensive Physiology* 5, (2015).
144. Pandey, E., Nour, A. S. & Harris, E. N. Prominent Receptors of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Liver Homeostasis and Disease. *Front. Physiol.* 11, (2020).
145. Rensen, P. C. N., Sliedregt, L., ferns, M., van Rossenberg, S., Leeuwen, S., Berkel, T., Biessen, E.. Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem* 276, (2001)
146. Grewal, P. K. Chapter Thirteen - The Ashwell–Morell Receptor. in *Methods in Enzymology* (ed. Fukuda, M.) vol. 479 223–241 (Academic Press, 2010).
147. Faure-Dupuy, S. *et al.* Characterization of Pattern Recognition Receptor Expression and Functionality in Liver Primary Cells and Derived Cell Lines. *J Innate Immun.* 10 (2018)

148. Knolle, P. A. & Wohlleber, D.. Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. *Cell Mol Immunol.* 13, (2016)
149. Uhrig, A., Banafshe, R., Kremer, M., Hegenbarth, S., Hamann, A., Neurath, M., Gerken, G., Limmer, A., knolle, P.. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol* 77, (2005)
150. Crispe, I. N. The Liver as a Lymphoid Organ. *Annu Rev Immunol.* 27, (2009).
151. Calne, R. Y., Sells, R. A., Pena, J. R. & Davis, D. R. Induction of immunological tolerance by liver allografts. *Nature* vol. 223 (1969).
152. Callery, P, Kamei, T., Flye, M.. The Effect of Portacaval Shunt on Delayed-Hypersensitivity Responses following Antigen Feeding. *Journal of Surgical Research* 46, (1989).
153. Lüth, S. *et al.* Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *J Clin Invest* 118, 3403–3410 (2008).
154. Limmer, A., Kurts, J., Ljunggren, H., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., Knolle, P.. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6, 1348–1354 (2000).
155. Doherty, D. G. Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 66, (2015).
156. Heymann, F. *et al.* Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology* 62, (2015)
157. Hoberg, E. P., Jones, A., Rausch, R. L., Eom, K. S. & Gardner, S. L. A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda : Taeniidae). *J Parasitol* 86, 89–98 (2000).
158. Dematteis, S., Piroto, F., Marqués, J., Nieto, A., Orn, A., Baz, A. Modulation of the cellular immune response by a carbohydrate rich fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in infected or immunized Balb/c mice. *Parasite Immunology* 23, 1–9 (2001).
159. Lin, G. *et al.* Further structural characterization of the *Echinococcus granulosus* laminated layer carbohydrates: The blood-antigen P1-motif gives rise to branches at different points of the O-glycan chains. *Glycobiology* 23, 438–452 (2013).
160. Weischenfeldt, J. & Porse, B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *Cold Spring Harb Protoc* 2008, pdb.prot5080 (2008).
161. Hu, T., Fu, Q., Chen, P., Zhang, K. & Guo, D. Generation of a stable mammalian cell line for simultaneous expression of multiple genes by using 2A peptide-based lentiviral vector. *Biotechnol Lett* 31, 353–359 (2009).
162. Tandon, N., Thakkar, K., LaGory, E., Liu, Y. & Giaccia, A. Generation of Stable Expression Mammalian Cell Lines Using Lentivirus. *BioProtocol Journal* 8, (2018).

163. Merten, O.W., Hebben, M. & Bovolenta, C. Production of lentiviral vectors. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development* 3, (2016).
164. Richardson, J. H., Child, L. A. & Lever, A. M. Packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA requires cis-acting sequences outside the 5' leader region. *Journal of Virology* 67, 3997–4005 (1993).
165. Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J. K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 8033–8037 (1993).
166. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).
167. Fong, Y. & Huang, Y. Modified Wilcoxon–Mann–Whitney Test and Power Against Strong Null. *The American Statistician* 73, 43–49 (2019).
168. Hollander, M., A. Wolfe, D. & Chicken, E. *Nonparametric Statistical Methods*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2015).
169. Conover, W. J. *Practical Nonparametric Statistics, 3rd Edition*. (John Wiley & Sons, 1999).
170. McDonald, J. *Handbook of Biological Statistics*. (Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland, USA, 2014).
171. Carralot, J.P., Kim, T., Lenseigne, B., Boese, A., Sommer, P., Genovesio, A., Brodin, P... Automated high-throughput siRNA transfection in raw 264.7 macrophages: a case study for optimization procedure. *J Biomol Screen* 14, 151–160 (2009).
172. Wong, J., Brugger, A., Khare, A., Chaubal, M., Papadopulos, p., Rabinov, B., Kipp, J., Ning, J.. Suspensions for intravenous (IV) injection: A review of development, preclinical and clinical aspects. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 939–954 (2008).
173. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement System Part I “ Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* 6, (2015).
174. Liu, Y., Gardner, C. R., Laskin, J. D. & Laskin, D. L. Classical and alternative activation of rat hepatic sinusoidal endothelial cells by inflammatory stimuli. (2014).
175. Mourglia-Ettlin, G., Merlino, A., Capurro, R. & Dematteis, S. Susceptibility and resistance to *Echinococcus granulosus* infection: Associations between mouse strains and early peritoneal immune responses. *Immunobiology* 221, 418–426 (2016).
176. Mourglia-Ettlin, G., Cucher, M., Arbildi, P., Rosenzvit, M. & Dematteis, S. Natural and induced antibodies contribute to differential susceptibility to secondary cystic echinococcosis of Balb/c and C57Bl/6 mice. *Immunobiology* 221, 103–115 (2016).
177. *Kupffer Cells: Methods and Protocols*. (Springer Nature, New York, NY, 2020).

178. Carroll, M. C. & Isenman, D. E. Regulation of Humoral Immunity by Complement. *Immunity* 37, 199–207 (2012).
179. Rezk, S. A., Nathwani, B. N., Zhao, X. & Weiss, L. M. Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. *Hum Pathol* 44, 937–950 (2013).
180. Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 14, (2014).
181. Li, Z. The local immune response during *Echinococcus granulosus* growth in a quantitative hepatic experimental model. *Sci Rep* 9, (2019)
182. Wang, H., Yu, Q., Wang, M., Hou, J., Wang, M., Kang, X., Hou, X., Li, D., Rousu, Z., Jiang, T., Li, J., Wen, H., Zhang, C.. Hepatic macrophages play critical roles in the establishment and growth of hydatid cysts in the liver during *Echinococcus granulosus sensu stricto* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases* (2023).
183. Breijo, M., Anesetti, G., Martinez, L., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. *Echinococcus granulosus*: The establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation. *Experimental Parasitology* (2008).
184. van Vliet, S. J., Saeland, E. & van Kooyk, Y. Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function. *Trends Immunol* 29, 83–90 (2008).
185. Grozovsky, R., Begonja, A., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J., Falet, H., Hoffmeister K.. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med* 21, 47–54 (2015).
186. Tiemeyer, M., Ishihara, B., Swiedler, S., Greene, J., Hoyle, G., Hill, R.. The binding specificity of normal and variant rat Kupffer cell (lectin) receptors expressed in COS cells. *J Biol Chem* 267, 12252–12257 (1992).
187. Galvan, M. D., Greenlee-Wacker, M. C. & Bohlsion, S. S. C1q and phagocytosis: the perfect complement to a good meal. *Journal of Leukocyte Biology* 92, 489–497 (2012).
188. Ghebrehwet, B., Hosszu, K. K., Valentino, A., Ji, Y. & Peerschke, E. I. B. Monocyte Expressed Macromolecular C1 and C1q Receptors as Molecular Sensors of Danger: Implications in SLE. *Front. Immunol.* 5, (2014).
189. Hutchins, N. A., Wang, F., Wang, Y., Chung, C.-S. & Ayala, A. Kupffer cells potentiate liver sinusoidal endothelial cell injury in sepsis by ligating programmed cell death ligand-1. *J Leukoc Biol.* 94, (2013)
190. 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 Immunology* 46, e13040 (2024).

191. Wilson, D. S., Damo, M., Hirose, S., Racz, M., Brungel, K., Diacri, G., Qualia-Thermes, X.. Synthetically glycosylated antigens induce antigen-specific tolerance and prevent the onset of diabetes. *Nature Biomedical Engineering* 3, (2019)
192. Debacker, A. J., Voutila, J., Catley, M., Blakey, D. & Habib, N. Delivery of Oligonucleotides to the Liver with GalNAc: From Research to Registered Therapeutic Drug. *Mol Ther* 28, 1759–1771 (2020).
193. Casey, L. M., Hughes, K., Saunders, M., Miller, S., Pearson, R., Shea, L.. Mechanistic contributions of Kupffer cells and liver sinusoidal endothelial cells in nanoparticle-induced antigen-specific immune tolerance. *Biomaterials* 283, (2022).
194. Noya, V., Bay, S., Festari, F., Garcia, E., Rodríguez, ., Chiale C., Ganneau, C., Baleuz, F., Astrada, S., Bollati-Fogolín, M., Osinaga, E., Freire, T.. Mucin-like peptides from *Echinococcus granulosus* induce antitumor activity. *International Journal of Oncology* 43, (2013).
195. Basika, T. Muñoz, N., Casaravilla, C., Irigoín, F., Batthyany, C., Bonilla, M., Salinas, G., Pacheco, J., Roth, J., Durán, R., Díaz, A.. Phagocyte-specific S100 proteins in the local response to the *Echinococcus granulosus* larva. *Parasitology* 139, 271–283 (2012).
196. Jebbawi, F. *et al.* Innate and adaptive immune responses following PD-L1 blockade in treating chronic murine alveolar echinococcosis. *Parasite Immunol.* 43, (2021)
197. Folle, A. M, Lagos-Magallanes, S., Fló, M., Alvarez-Rosado, R., Carrión, F., Vallejo, C., Watson, D., Julve, J., González-Sapienza, G., Pristch, O., González-Techera, A., Ferreira, A. M.. Modulatory actions of *Echinococcus granulosus* antigen B on macrophage inflammatory activation. *Front Cell Infect Microbiol* 14, 1362765 (2024).



Mucins Shed from the Laminated Layer in Cystic Echinococcosis Are Captured by Kupffer Cells via the Lectin Receptor Clec4F

Anabella A. Barrios,^a Camila Mouhape,^a Leonard Schreiber,^b Linyun Zhang,^b Juliane Nell,^b Mariana Suárez-Martins,^a Geraldine Schlapp,^c María Noel Meikle,^c Ana Paula Mulet,^c Tsui-Ling Hsu,^d Shie-Liang Hsieh,^d Gustavo Mourglia-Ettlin,^a Carlos González,^e Martina Crispo,^c Thomas F. E. Barth,^b Cecilia Casaravilla,^a Stephen J. Jenkins,^f Álvaro Díaz^a

^aÁrea Inmunología, Departamento de Biociencias (Facultad de Química) and Cátedra de Inmunología, Instituto de Química Biológica (Facultad de Ciencias), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^bInstitute of Pathology, University Ulm, Ulm, Germany

^cUnidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

^dGenomics Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan

^eIndependent Researcher, Montevideo, Uruguay

^fUniversity of Edinburgh Centre for Inflammation Research, Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom

ABSTRACT Cystic echinococcosis is caused by the larval stages (hydatids) of cestode parasites belonging to the species cluster *Echinococcus granulosus sensu lato*, with *E. granulosus sensu stricto* being the main infecting species. Hydatids are bladderlike structures that attain large sizes within various internal organs of livestock ungulates and humans. Hydatids are protected by the massive acellular laminated layer (LL), composed mainly of mucins. Parasite growth requires LL turnover, and abundant LL-derived particles are found at infection sites in infected humans, raising the question of how LL materials are dealt with by the hosts. In this article, we show that *E. granulosus sensu stricto* LL mucins injected into mice are taken up by Kupffer cells, the liver macrophages exposed to the vascular space. This uptake is largely dependent on the intact mucin glycans and on Clec4F, a C-type lectin receptor which, in rodents, is selectively expressed in Kupffer cells. This uptake mechanism operates on mucins injected both in soluble form intravenously (i.v.) and in particulate form intraperitoneally (i.p.). In mice harboring intraperitoneal infections by the same species, LL mucins were found essentially only at the infection site and in the liver, where they were taken up by Kupffer cells via Clec4F. Therefore, shed LL materials circulate in the host, and Kupffer cells can act as a sink for these materials, even when the parasite grows in sites other than the liver.

KEYWORDS *Echinococcus*, laminated layer, lectin, mucin, Kupffer cells, Clec4F

The larval stages of the cestode parasites belonging to the species cluster known as *Echinococcus granulosus sensu lato* (distinguishable only by molecular means) cause cystic echinococcosis in livestock animals, including sheep and cattle, as well as in humans (1, 2). Most cystic echinococcosis worldwide, both in humans and in livestock species, is caused by the species *E. granulosus sensu stricto* (3). Cystic echinococcosis is characterized by the growth within organ parenchyma of bladder-like parasite structures called hydatids. Each hydatid is bounded by a thin cellular layer, in turn protected by a thick acellular coat called the laminated layer (LL) (4–7). The main component of the LL is a meshwork of mucins, heavily decorated by O-glycans that are rich in galactose (8, 9). Hydatids persist in internal organs of immunocompetent hosts for up to decades, and they usually elicit weak local inflammation (10). The growth of the hydatid (potentially through over 3 orders of magnitude in lineal dimension) requires the shedding of materials from the LL (4–7). In human infections, the abundant shed LL

Editor DeBroski R. Herbert, University of Pennsylvania

Copyright © 2023 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Álvaro Díaz, adiaz@fq.edu.uy.

The authors declare no conflict of interest.

Received 18 January 2023

Returned for modification 11 February 2023

Accepted 17 April 2023

particles (termed SPEGs, for shed particles of *E. granulosus*) are found in the tissue surrounding the parasite and in the draining lymph nodes (11).

The persistence of larval *E. granulosus* infection, the massive nature of the LL, and the sheer abundance of shed particles as detected in human infection call the question of how the host's body disposes of this foreign debris and avoids the potential inflammation that may result from its buildup. As inflammation is detrimental to the parasite (10), it makes biological sense that LL constituents may be evolutionarily perfected for engaging cellular receptors that will ensure noninflammatory disposal of the shed materials.

Studies on the responses elicited in mouse dendritic cells (DCs) and macrophages by a preparation of *in vitro*-produced LL particles (pLL, from particulate LL) have suggested an interaction mode independent of conventional receptors and inefficient phagocytosis, at least in the absence of opsonization (7, 12, 13). In broad agreement, none out of 35 human innate carbohydrate recognition proteins (recombinantly expressed as fusions with IgG Fc) bound the LL mucins in an *in vitro* screening (14). However, in the same experiment, strong binding was observed for mouse Clec4F. This type II, trimeric, cell surface C-type lectin has an affinity for glycans terminated in *N*-acetylgalactosamine or galactose (Gal), especially when they occur in tandem along the same backbone, as it happens in mucins (15–19). The binding of recombinant Clec4F to the LL mucins was, as expected, calcium dependent and resistant to digestion of nonmucin proteins in the parasite preparation. Binding was also observed to a number of synthetic glycans representing some of the main carbohydrate motifs in the *E. granulosus* LL and/or in the LL of the related species, *Echinococcus multilocularis* (14).

In rodents, Clec4F is exclusively expressed in Kupffer cells (KCs) (15–17), the sessile liver macrophages exposed to the vascular space. This restricted expression means that Clec4F is not expressed in the mouse DCs and macrophage subtypes used in the previously mentioned experiments that suggested a receptor-independent interaction mode with LL particles (7, 12, 13). In the ungulate natural hosts of *E. granulosus*, Clec4F appears to be expressed in lymphoid tissues in addition to the liver (16). In humans, Clec4F is not functional as a lectin and is poorly or not expressed (16).

The only demonstrated function of Clec4F (in mice) is the removal from circulation of desialylated platelets by KCs (20). Although the macrophage galactose-type lectins (MGLs) and the asialoglycoprotein receptor (ASGR; reported to be expressed in KCs in addition to in hepatocytes) collaborate in this function, Clec4F appears to fulfill an indispensable role (20–22).

KCs, under basal conditions, have a tolerogenic profile as antigen-presenting cells (23). Also, the role of Clec4F in removing desialylated platelets (20), conceptually akin to the role of the receptors involved in phagocytosis of apoptotic cells (24), suggests that Clec4F is not wired to inflammatory responses. Thus, Clec4F/KC appears to be an evolutionary option from the parasite's standpoint for LL debris disposal. However, *in vitro* binding by the soluble Clec4F lectin domain expressed in dimeric form (14) does not predict binding by the native cell surface trimeric receptor or internalization by KCs. In this article, we analyze *in vivo* uptake of soluble and particulate *E. granulosus sensu stricto* LL materials by KCs and the role of Clec4F in this process, in the context of artificial injection of materials as well as experimental infection.

RESULTS

Soluble LL mucins are taken up by Kupffer cells *in vivo* in a manner dependent on the mucin glycans. We first sought to determine whether KCs take up a preparation of soluble LL mucins (sLL) *in vivo* and whether this is dependent on the mucin glycans. We thus treated the LL mucins either with sodium periodate to oxidize the glycans or applied a mock treatment, tagged both preparations with equivalent amounts of biotin (see Fig. S1 in the supplemental material), and injected both preparations intravenously (i.v.) in mice. Twenty minutes later, we quantitated the biotin tag in permeabilized non-parenchymal liver cells using streptavidin conjugated to phycoerythrin (PE) and flow cytometry. KCs were identified using our previously validated gating strategy (Fig. S2) (25). A significant signal was detected in KCs, and the signal was markedly higher for

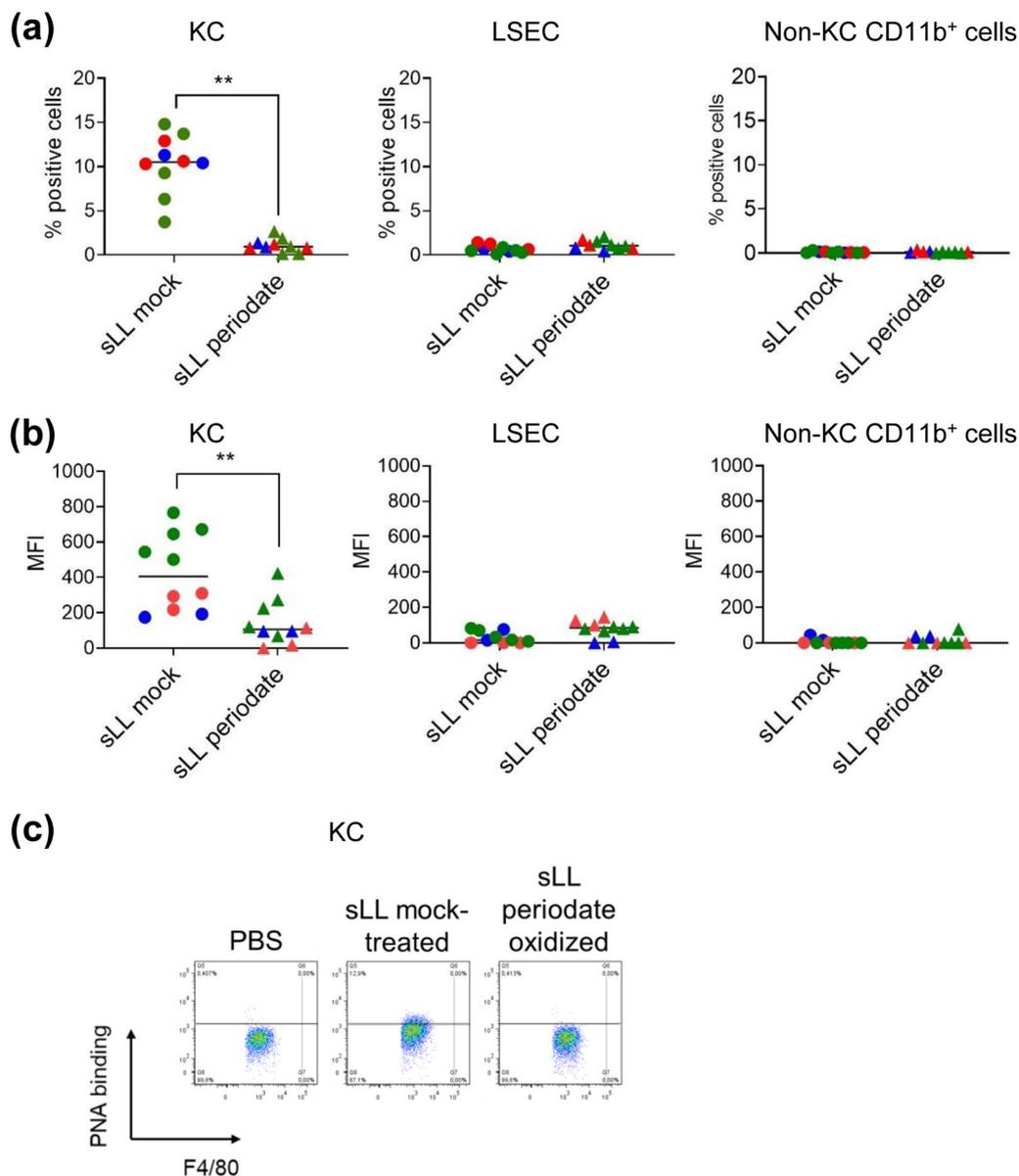


FIG 1 Soluble LL mucins are taken up selectively by KCs, dependent on mucin glycans. C57BL/6 mice were injected i.v. with 100 μ g dry mass of solubilized, biotin-derivatized LL mucin preparation (sLL), either treated with periodate to oxidize their terminal monosaccharide residues or mock treated. Twenty minutes later, mice were sacrificed, and sLL uptake was quantitated in permeabilized liver nonparenchymal cells using streptavidin-PE. (a and b) Data are shown for the cell types that are relevant in the context of the article, namely, KCs, LSECs, and non-KC CD11b⁺ cells in terms of percentages of positive cells (a) and geometric means of fluorescence intensity (b). (c) Representative dot plots for KCs are shown. The signal threshold for each cell type was established using cells from mice injected with vehicle only and similarly stained; the fluorescence intensity data had the median values corresponding to vehicle-injected mice subtracted for plotting. Results are pooled from 3 independent experiments (represented in different colors); individual mice and their overall median values are shown. The statistical analyses were carried out on the crude data by the Mack-Skillings test.

mock-treated than for periodate-treated sLL (Fig. 1). No significant biotin signal was detected in either liver sinusoidal epithelial cells (LSECs) or in non-KC CD11b⁺ cells, a broad definition that encompasses any mononuclear phagocytes other than KC present in the liver (Fig. 1a and b and Fig. S2).

The plant lectin PNA and the E492 monoclonal antibody allow detection of laminated layer mucins captured by liver cells *in vivo*. Except in experiments using periodate-treated LL materials, the detection of LL materials by appropriate carbohydrate-binding probes was preferable to prior labeling with biotin. Among other advantages, such probes would allow the detection of endogenous LL mucins in infected animals. One

candidate probe was the plant lectin peanut agglutinin (PNA), which binds Gal β 1-3-GalNAc α 1-peptide, i.e., the nondecorated mucin O-glycan core 1 or T antigen (26). This motif is highly represented in the *E. granulosus* LL, and accordingly, PNA binds the LL mucins in histological sections, particle lectin fluorescence, and Western blotting (13, 27). The second candidate probe was the monoclonal antibody E492, raised against *E. granulosus* protoscoleces (28). This antibody binds to LL mucins from *E. multilocularis* (29) and to synthetic glycans that include the P₁ blood antigen motif (Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc), highly represented among *E. granulosus* LL mucin glycans (8, 9). A third potential probe was recombinant Clec4F (14). We verified that these potential probes indeed bind to sLLs coated on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plates as well as to LL particles in suspension (Fig. 2a and b).

We took advantage of the defined specificities of PNA and the E492 antibody to gain insight into the carbohydrate motifs bound by Clec4F in the LL mucins. The binding of recombinant Clec4F to the solubilized and plate-bound LL mucins was not competed by PNA, but it was strongly competed by the E492 antibody (Fig. 2c). Therefore, most of the binding of Clec4F to the native LL mucins appears to rely on recognition of the P₁ motif, whereas recognition of the T antigen is not significant. This, in turn, suggests that in the LL mucins, the T antigen may not be exposed and/or be spaced inadequately for Clec4F binding, as recombinant Clec4F does bind the T antigen in glycan arrays (16–18).

In vivo probes should show minimal reactivity with host tissues; for our purposes, lack of reactivity with the populations of mouse nonparenchymal liver cells under study was the most important consideration. Neither PNA nor the E492 antibody showed significant binding in flow cytometry to KCs or LSECs from control mice (Fig. S3). PNA bound to a very minor fraction of non-KC CD11b⁺ cells, whereas the antibody did not bind. PNA, but not the E492 antibody, bound to a major subpopulation of CD45⁺ CD11b⁻ F4/80⁻ cells, which were not of particular interest in our study. Recombinant Clec4F bound to cells in all 4 cell gates defined, most strongly to LSECs and KCs (Fig. S3). This probably reflects the fairly broad specificity of Clec4F for glycans terminated in Gal/GalNAc (16–18) and ruled out this lectin as a probe for our purposes.

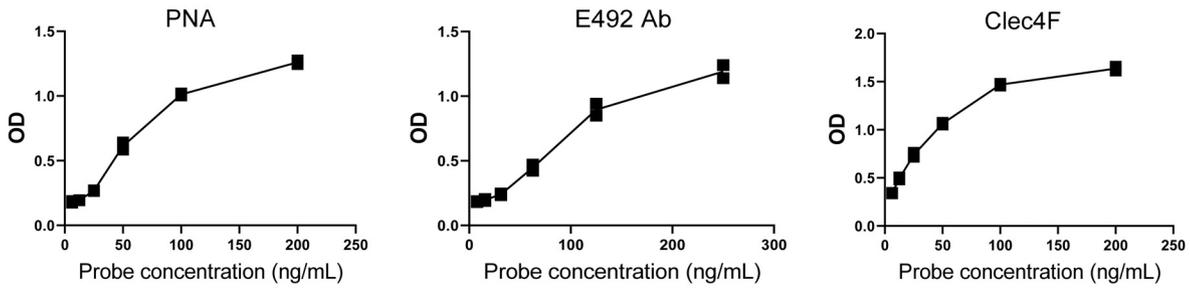
Finally, to determine whether uptake of sLLs could be measured *in vivo* using PNA or the E492 antibody, we injected wild-type (WT) C57BL/6J mice i.v. with sLL and subsequently stained isolated hepatic nonparenchymal cells intracellularly with either probe. As expected, no staining was observed in cells from mice injected with phosphate-buffered saline (PBS) only, whereas KC and, to a small extent, also LSECs from mice given sLL stained intracellularly with either PNA or E492 antibody (Fig. 2d). Omitting the cell permeabilization step caused the PNA signal in KCs and LSECs of sLL-injected mice to be reduced to negligible levels (data not shown), ruling out the remote possibility that injection of sLL induces the expression of ligands for the probe in the glycocalyx of the cells under study. Both PNA and the E492 antibody appeared to allow more sensitive detection than prior labeling with biotin (Fig. 1), so that captured sLL was detected in almost all KCs and also in some LSECs.

In summary, both PNA and the E492 antibody are useful probes for LL mucins captured by mouse nonparenchymal liver cells.

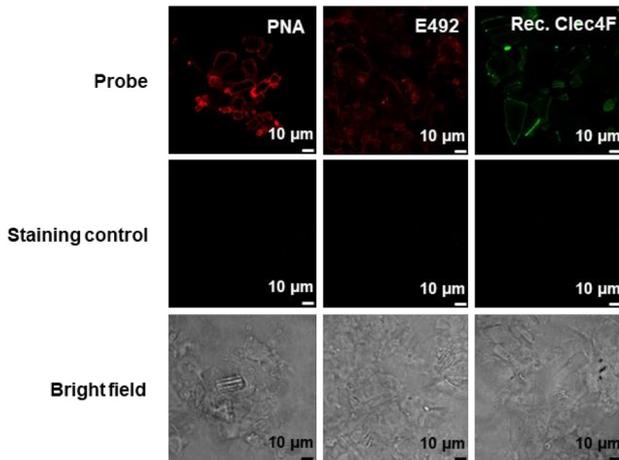
Soluble LL mucins are taken up by Kupffer cells *in vivo* in a manner dependent on Clec4F. We first used CRISPR/Cas9 to generate a new Clec4f^{-/-} line on the C57BL/6J background. These Clec4f^{-/-} mice have an 8-bp deletion expected to result in a polypeptide that is truncated near the N terminus (Fig. 3a and b) and effectively lack Clec4F protein expression by flow cytometry (Fig. 3c). Hence, our line appears similar to Clec4f gene-deficient mice that have already been described (17, 20).

We next compared WT and Clec4f^{-/-} mice in terms of the *in vivo* uptake of sLL by liver nonparenchymal cells. For this purpose, we injected untagged sLL, either untreated or subjected to the mock treatment used in the previous experiments that involved periodate oxidation. Uptake of sLL by KC was strongly dependent on Clec4F (Fig. 4a to c), particularly when assessed in terms of mean fluorescence intensity. The low-level uptake by LSECs observed was, as expected, independent of Clec4F; in fact, for untreated sLL, uptake by

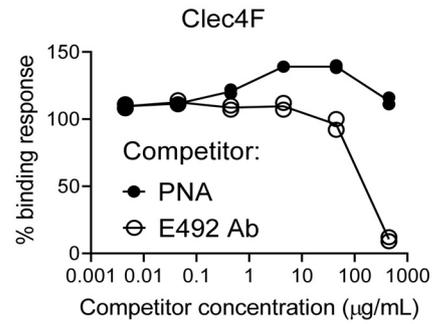
(a) ELISA format



(b) Immuno/lectin fluorescence on particles



(c) Competition ELISA format



(d) Flow cytometry gated on KC and LSEC

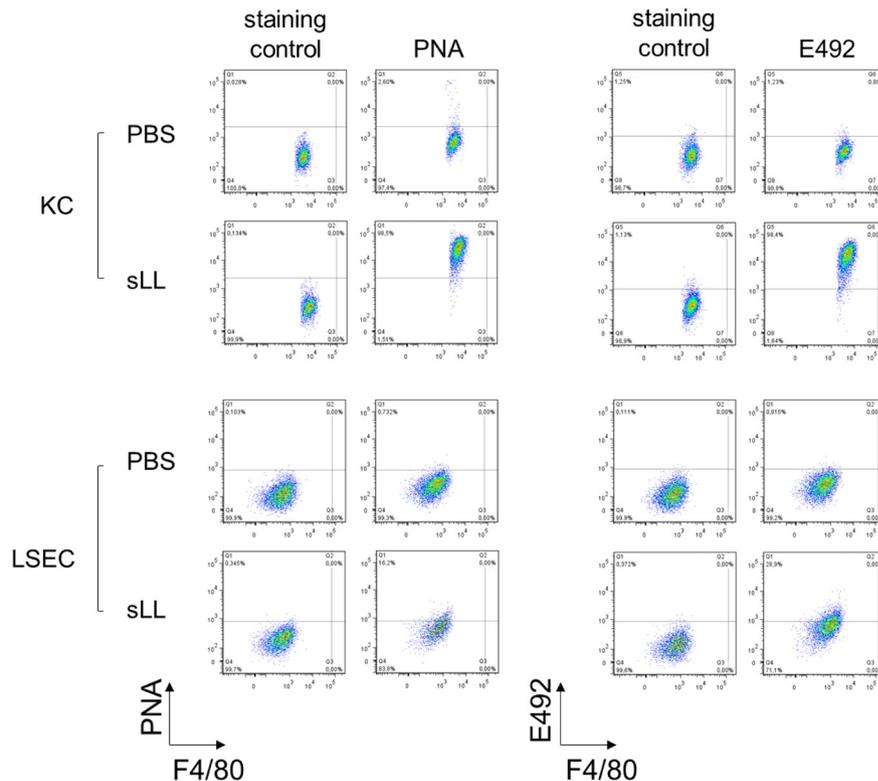


FIG 2 PNA and the E492 antibody are suitable probes for LL mucins captured by mouse KCs. (a and b) The binding of PNA, the E492 antibody, and soluble recombinant Clec4F to LL mucins coated onto ELISA plate wells (a) or present in LL particles in suspension (b) (Continued on next page)

LSECs was slightly enhanced in the absence of Clec4F, possibly as a result of the decreased capture by KC. No uptake by non-KC CD11b⁺ cells was detected (Fig. 4a and b and Fig. S4). Through a calculation that takes into account the numbers of each cell type capturing sLL and the intensity of the signal indicating intracellular sLL, KCs were estimated to be responsible for the overwhelming majority of sLL uptake by nonparenchymal liver cells in WT mice (Fig. 4d). However, in the absence of Clec4F, LSECs played a significantly, if slightly, more important part in the uptake of sLL than in the presence of the receptor. Differences in the uptake of untreated versus mock-treated material were not observed, except in the low-level uptake by LSEC in Clec4f^{-/-} mice (Fig. 4a). For consistency with the results shown in Fig. 1, we chose to use mock-treated material in the following experiments.

It can be expected that in the absence of Clec4F, other mechanisms of cellular uptake of sLL may become apparent, e.g., macropinocytosis or uptake dependent on natural antibodies or complement (7). Such Clec4F-independent uptake of sLL was hinted at by the previous observations in relation to LSECs, as well as by the 25 to 60% KCs in Clec4f^{-/-} mice positive for PNA at low levels (Fig. 4a to c). As the Clec4F-independent mechanisms might become dominant at longer analysis times, we carried out a similar experiment with a 22-h analysis time. Uptake of sLL was still dominated by KCs among the cell types studied, and this uptake was again strongly dependent on Clec4F (Fig. 5a to d). In the absence of Clec4F, LSECs made a significantly larger contribution to sLL uptake than in the presence of the receptor, but this contribution was still minimal (Fig. 5d). Non-KC CD11b⁺ cells did not take up material detectably (Fig. 5a to d and Fig. S4). Cell surface expression of Clec4F in KCs was not altered by sLL injection (Fig. S5).

In summary, soluble circulating LL mucins in naive mice are taken up mainly by KCs among liver nonparenchymal cells and mostly in a Clec4F-dependent fashion.

LL mucins injected in particulate form are taken up by Kupffer cells *in vivo* in a Clec4F-dependent manner. Although the release of soluble mucins from the LL during cystic echinococcosis is a possibility (7), only particles have been documented to be shed from the LL in human infections (7, 11). It is not known if these particles circulate systemically and/or give rise to soluble materials that circulate. It was therefore important to determine whether Clec4F participates in the uptake by KCs of LL mucins released in a particulate presentation into the internal milieu and at an anatomical site distant from the liver. We thus injected intraperitoneally (i.p.) a preparation of particulate LL mucins (pLL) (13) and analyzed the liver nonparenchymal fraction 22 h later. LL material was indeed detected by flow cytometry in KCs (Fig. 6a to c and Fig. S6a to c). Uptake by KC was dependent on Clec4F, although there was a considerable degree of Clec4F-independent uptake as well. In addition to low-level uptake by LSECs, in this experimental system, non-KC CD11b⁺ cells were observed to take up the LL material. Although non-KC CD11b⁺ cells may include recruited monocytes and macrophages, the frequency of this population (within all nonparenchymal cells) did not increase as a result of pLL injection (Fig. S7). As expected, uptake by LSECs and by non-KC CD11b⁺ cells was independent of Clec4F and, in fact, tended to be enhanced in the absence of the receptor (Fig. 6a to c and Fig. S6a to c). Indeed, whereas in WT mice, the overwhelming majority of the LL material uptake by liver nonparenchymal cells was carried out by KCs, in Clec4f^{-/-} mice, the two non-KC cell types studied, taken together, played a significantly larger role than in WT mice (Fig. 6d and Fig. S6d). The cell surface expression of Clec4F in KCs was not altered by injection of pLL (Fig. S8).

The mostly Clec4F-dependent uptake of the LL material was confirmed by histology, using the E492 antibody as a probe. Strong staining was observed in KC-like cells of WT animals, whereas only minimal staining was observed in the KC-like cells of

FIG 2 Legend (Continued)

was studied. (c) The capacity of PNA and the E492 antibody to compete with the binding of recombinant Clec4F to LL mucins was analyzed in a competition ELISA format; results are expressed in relation to the response in the absence of competitor. In panels a and c, analytical duplicates are shown. (d) WT C57BL/6 mice were injected i.v. either with PBS only or with solubilized LL mucins (200 μ g/mouse), and 22 h later, KCs and LSECs were analyzed by flow cytometry using either PNA or the E492 antibody as probes after cell permeabilization. Staining controls shown in panels b and d correspond to samples stained in the same way as the positive ones except that the primary probe for LL material was omitted, and the analogous controls in panel a gave no signal.

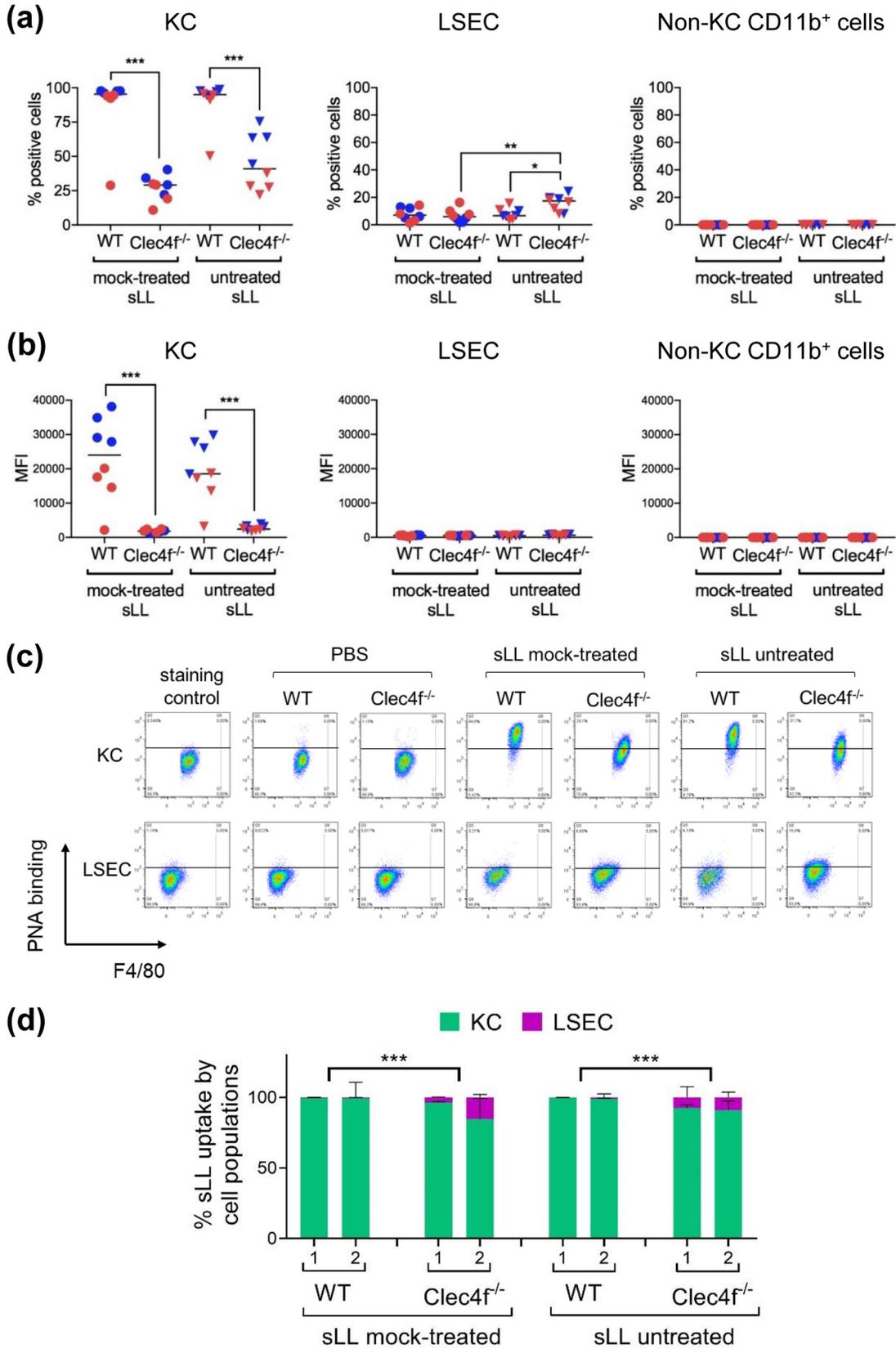


FIG 4 Fast uptake of soluble LL mucins by Kupffer cells depends largely on Clec4F. WT and Clec4F^{-/-} mice were injected i.v. with 200 μg dry mass of sLL, either untreated or mock-treated as in Fig. 1 or vehicle only (PBS). Twenty minutes later, mice were sacrificed, and sLL uptake was quantitated in nonparenchymal liver cell populations by flow cytometry in permeabilized (Continued on next page)

Clec4f^{-/-} animals (Fig. 6e). The cells taking up pLL were formally identified as KCs by dual-color fluorescence using F4/80 as KC marker and antibody E492 as a probe for pLLs (Fig. 6f). Animals injected with pLLs also showed weak staining in hepatocytes (a cell type not analyzed by flow cytometry), and this was independent of Clec4F (Fig. 6e). As hepatocytes are unlikely to phagocytose large particles, this observation suggests that the particles injected release small particles and/or soluble mucin materials *in vivo* that preferentially circulate systemically.

In summary, LL mucins present within tissues in particulate form can generate materials (particulate and/or soluble) that circulate systemically and that are captured by KCs via Clec4F.

In experimental *E. granulosus* infection, LL mucins circulate and are captured selectively by Kupffer cells, with the participation of Clec4F. We next wished to determine if Clec4F was relevant in the infection setting. The most widely used experimental infection model for *E. granulosus sensu lato* uses intraperitoneal injection with protoscoleces, parasite stages that usually develop into adult worms but are capable of reverse development into hydatids (1, 30). In this model, hydatids develop free or within host collagen capsules in the peritoneal cavity (31). KC uptake of LL materials in this model would require that such materials reach systemic circulation, a possibility for which there was no evidence in experimental or natural infections. We first analyzed infected mice of the BALB/c strain in which experimental infection reaches higher parasite burdens than in the C57BL/6 strain (32). Indeed, the BALB/c mice analyzed had a median of 25 mL of total parasite volume (Fig. S9a), an extremely high parasite burden. In these mice, using the E492 antibody as probe, we detected LL materials by histology in peritoneal cavity cells (i.e., the site of infection) and the liver, but not in kidneys, intestine, or lungs (Fig. 7a). In addition, in some of the infected mice, occasional positive cells were observed in the spleen and less frequently in the mesenteric lymph nodes (Fig. 7a). The use of PNA as probe yielded similar results, but it was complicated by the expected signal in the lymphoid organs (33) unrelated to LL material, i.e., detectable in noninfected mice (data not shown).

The above-described results show that in infected animals, LL mucins circulate systemically and become selectively concentrated in the liver. Within the liver, the signal for LL mucins was specifically concentrated in KC-like cells (Fig. 7a). The LL signal in KC-like cells was observed in 12 out of 15 infected mice analyzed. The cells taking up LL materials were formally identified as KCs by dual-color fluorescence using both F4/80 and Clec4F as KC markers and antibody E492 as probe for LL materials (Fig. 7b). Contrary to previous experiments injecting pLL, no signal was detected in hepatocytes. This may be related to lower loads of LL material, as suggested by the lower intensity in the staining in KCs in the infection setting in comparison to the pLL injection experiments (compare Fig. 6e and Fig. 7a).

The selective LL material uptake by KC among the liver nonparenchymal cells was confirmed by flow cytometry (Fig. 7c to e and Fig. S10). Although the data did not reach statistical significance, a subpopulation of non-KC CD11b⁺ cells appeared to take up LL materials (Fig. 7c to d). Also, the frequency of non-KC CD11b⁺ cells within all liver nonparenchymal cells was significantly increased by infection, suggesting cell recruitment (Fig. S11a). The cell surface expression of Clec4F in KC was not altered by infection (Fig. S12a).

We next analyzed infected C57BL/6 WT and Clec4f^{-/-} mice. In these mice, the parasite burdens were low: the median burden in the WT C57BL/6 mice was 0.5 mL (this figure corresponds to the two infection experiments fully analyzed, as an additional

FIG 4 Legend (Continued)

cells using PNA. (a and b) Results are shown for KCs, LSECs, and non-KC CD11b⁺ cells in terms of percentages of positive cells (a) and mean fluorescence intensities (b). (c) Representative flow cytometry plots are shown for KCs and LSECs. (d) An estimation of the fraction of sLL taken up by each of the cell populations under study, calculated as explained in Materials and Methods, is shown; the statistics shown compare the fractions taken up by KCs. The positive cell threshold was established using cells from the mice injected with PBS only. The data arise from two independent experiments, represented in blue and red in panels a to c and indicated as 1 and 2 in panel d. (a to c) Individual mice and their median values are shown. (d) Only medians are shown. The statistical analyses were carried out by the Mack-Skillings test.

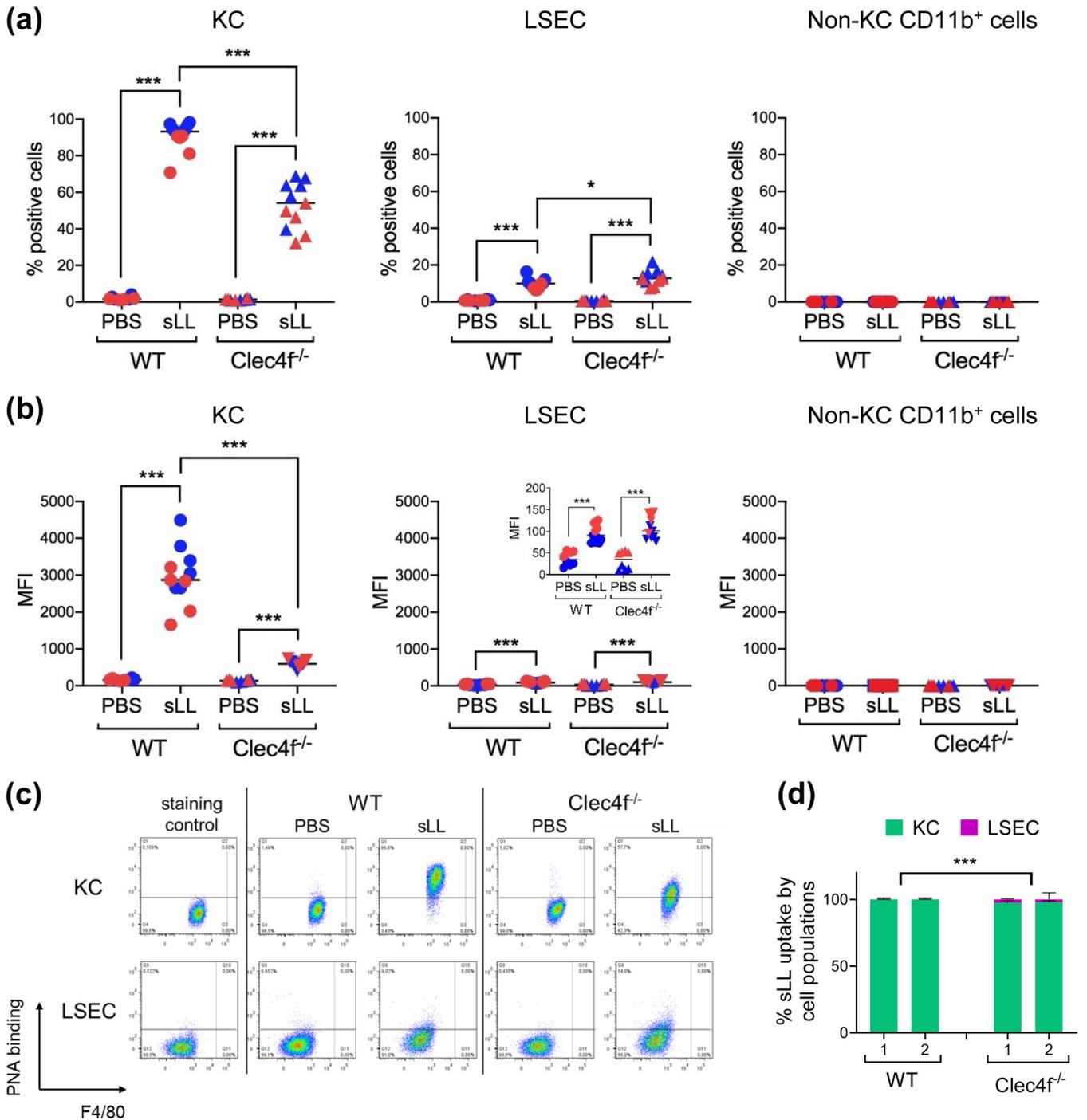


FIG 5 Clec4F is important for the capture of soluble LL mucins by Kupffer cells even after allowing a long uptake time. WT and Clec4f^{-/-} C57BL/6 mice were injected i.v. with 200 μg dry mass per mouse of sLL (mock treated as in Fig. 1) or PBS only as a control. Twenty-two hours later, mice were sacrificed, and sLL uptake was quantitated in liver nonparenchymal cells by flow cytometry using PNA after cell permeabilization. (a and b) Results are shown for KCs, LSECs, and non-KC CD11b⁺ cells in terms of percentages of positive cells (a) and mean fluorescence intensities (b). (c) Representative flow plots for KCs and LSECs are shown. (d) An estimation of the fraction of sLL taken up by each of the cell populations under study, calculated as explained in Materials and Methods, is shown; the statistics shown compare the fractions taken up by KCs. The positive cell threshold was established using staining controls (in which only biotinylated PNA was omitted). The PNA signal in nonpermeabilized cells was negligible. The data arise from two independent experiments, represented in blue and red in panels a to c and indicated as 1 and 2 in panel d. (a to c) Individual mice and their median values are shown. (d) Only medians are shown. The statistical analyses were carried out by the Mack-Skillings test (a to c) and the modified Wilcoxon-Mann-Whitney tests (d).

experiment with very low parasite burdens was excluded from analysis). Although the median parasite burden was 3-fold lower in Clec4f^{-/-} mice than in WT mice, the trend did not reach statistical significance (Fig. S9b). By flow cytometry, uptake of LL material by KCs was detected in WT, but not in Clec4f^{-/-}, mice (Fig. 7f to h). No significant

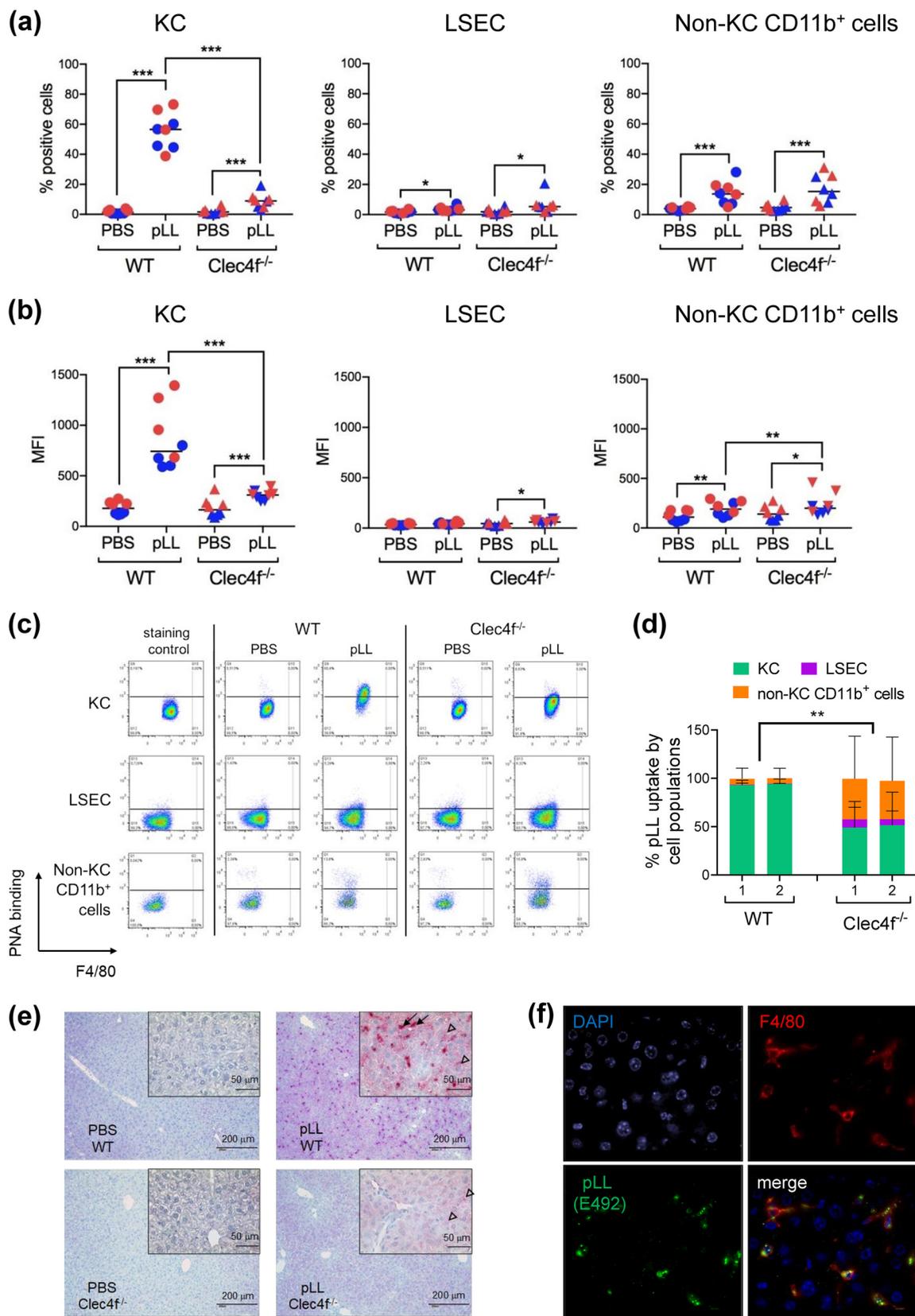


FIG 6 The uptake by Kupfer cells of LL mucins injected in particulate presentation depends largely on Clec4F. WT and Clec4f^{-/-} C57BL/6 mice were injected i.p. with 450 μg dry mass of pLL or PBS only as a control. Twenty-two hours later, mice were sacrificed, and pLL uptake was quantitated in liver nonparenchymal cells by flow cytometry using PNA after cell permeabilization. (a and b) (Continued on next page)

uptake was detected in LSECs (Fig. 7f and g and Fig. S10b). In non-KC CD11b⁺ cells, there was a trend toward low-level, Clec4F-independent uptake (Fig. 7f to h), which did not reach significance. The frequency of non-KC CD11b⁺ cells was not significantly altered by infection (Fig. S11b). Again, Clec4F surface expression in the KCs of WT mice was not altered by infection (Fig. S12b).

DISCUSSION

In this article, we show that native LL materials shed from *E. granulosus sensu stricto* hydatids are taken up selectively by KCs in a fashion mostly dependent on Clec4F. It is thought that pathogens capable of immune evasion engage innate receptors that normally bind altered self structures, as opposed to receptors specialized in detecting pathogens and triggering inflammatory responses (34). *E. granulosus* is well adapted for immune evasion (2), and the fact that its most abundant surface molecules engage a receptor involved in the clearing of aged host platelets (20, 21) seems to be in line with the above-described principle.

KCs are specialized in removing unwanted materials from the blood. Our results imply that the LL mucins (which, even after their artificial solubilization, behave as having very high molecular sizes [27]) have the capacity to circulate systemically, thus reaching KCs from a distant anatomical site. This applies to exogenous LL mucins initially present in the peritoneal cavity in particulate format, which must therefore either circulate as particles and/or partly solubilize *in vivo*. It also applies to the LL materials released by live parasites growing in the peritoneal cavity.

In addition to KCs, both LSECs and certain non-KC CD11b⁺ cells were observed to take up LL materials. This was, in both cases, independent of Clec4F, and in some experimental settings, it was enhanced in the absence of Clec4F (Fig. 4d, Fig. 5d, Fig. 6d, and see Fig. S6d in the supplemental material). Uptake of materials by non-KC CD11b⁺ cells was apparent after injection of LL mucins in particulate presentation (pLL) (Fig. 6a to d and Fig. S6), but not in a soluble presentation (sLL) (Fig. 1, 4, and 5). This contrast suggests that the species released *in vivo* from the large LL particles and capable of circulating are (or at least include) small particles, as opposed to fully soluble mucins like those making up sLLs. The fact that uptake by the non-KC CD11b⁺ population was clear after injection of a high-dose bolus of pLL, whereas it was merely hinted at in experimental infection (Fig. 7c to h), is most probably explained by this uptake mechanism becoming relevant only when the uptake capacity of KCs is overwhelmed. It is unlikely that the non-KC CD11b⁺ cell population taking up LL materials derives from peritoneal cavity macrophages, as it is composed of F4/80⁻ cells (Fig. 6c and Fig. S6c), whereas most resident peritoneal macrophages, as well as peritoneal macrophages, reported to enter the liver upon injury to this organ are F4/80^{hi} (35). We instead favor the possibility that the population being discussed corresponds to monocytic cells present in the liver or recruited in response to LL particles physically trapped in the liver sinusoids.

Hepatocytes could be an additional target cell for LL materials in the liver, as suggested by the weak but significant staining observed in this cell type after pLL injection (Fig. 6e). The obvious candidate receptor to mediate this apparent uptake is the ASGR (36). Ligand uptake by hepatocytes via the ASGR is reported to have an upper size limit of 70 nm (37). Thus, the signal in hepatocytes observed in our experiments with pLL

FIG 6 Legend (Continued)

Results are shown for KCs, LSECs, and non-KC CD11b⁺ cells in terms of percentages of positive cells (a) and mean fluorescence intensities (b). (c) Representative dot plots for the three cell types are shown. (d) An estimation of the fraction of sLL taken up by each of the cell populations under study, calculated as explained in Materials and Methods, is shown; the statistics shown compare the fractions taken up by KC. The positive cell threshold was established using staining controls. The data arise from two independent experiments, represented in blue and red in panels a to c and indicated as 1 and 2 in panel d. (a to c) Individual mice and their median values are shown. (d) Only medians are shown. The statistical analyses were carried out by the Mack-Skillings test. The analogous flow cytometry results obtained using the E492 antibody for detection are shown in Fig. S6 in the supplemental material. (e) In addition, pLL was detected in liver sections, using the E492 antibody, by chromogenic histology. Black arrows indicate KC-like cells staining strongly for LL material, and empty arrowheads indicate hepatocytes staining weakly for LL material. (f) The localization of LL materials in KCs from infected mice was confirmed by fluorescence histology, using the E492 antibody as probe and F4/80 as KC marker (original magnification, $\times 630$).

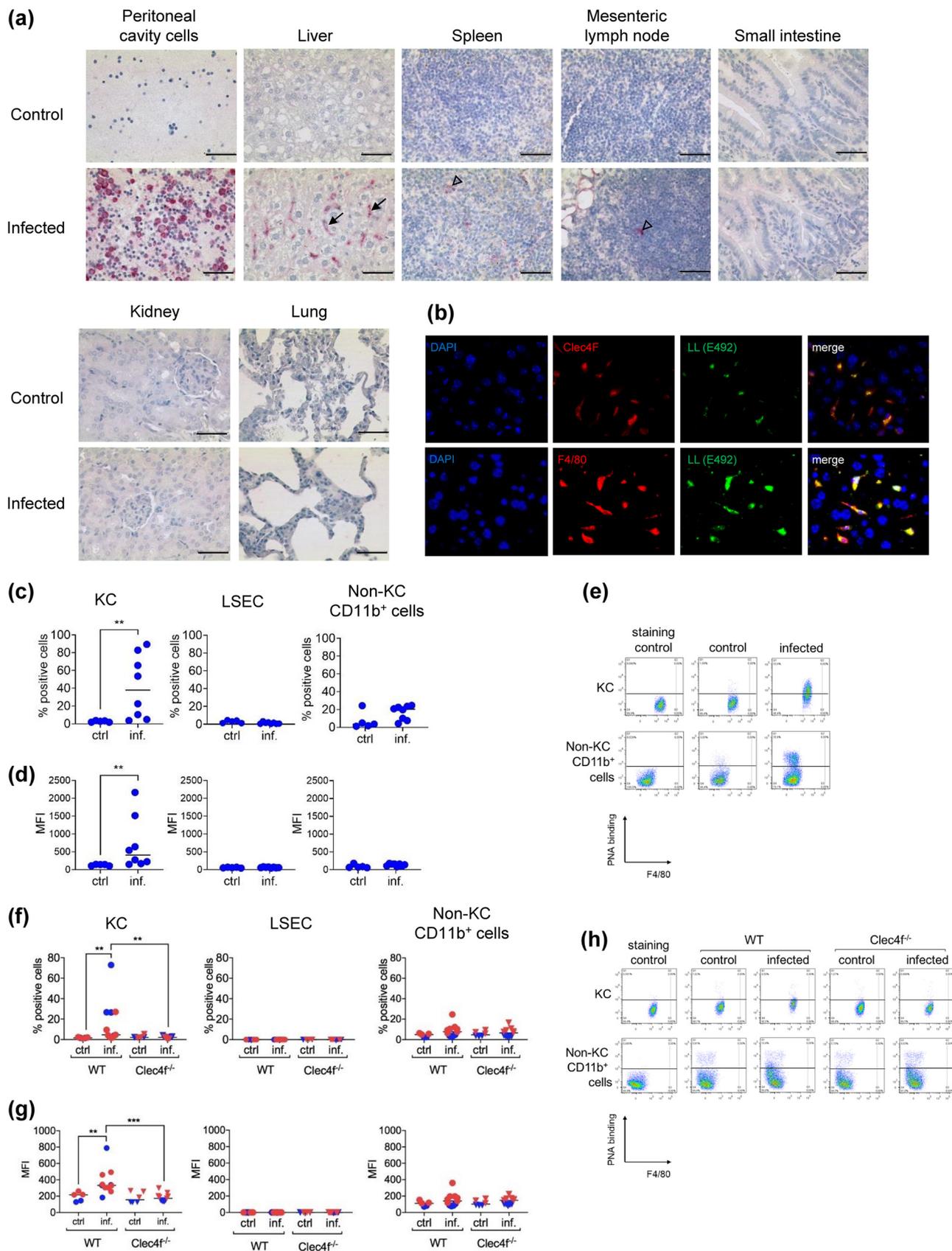


FIG 7 LL materials circulate systemically in infected mice and are captured selectively by Kupffer cells via Clec4F. (a) BALB/c mice (WT) were intraperitoneally infected with *E. granulosus* protoscolexes or injected with the corresponding volume of buffer only. Seven months later, the
(Continued on next page)

(which have particle sizes in the micrometer range [13]) may correspond to uptake of soluble mucins released from the particles *in vivo*. In the same experiments, as well as in the infection experiments (Fig. 7), the preferential uptake by KCs in relation to hepatocytes surely reflects the differential capacity of KCs to phagocytose particles (even if, additionally, Clec4F may bind LL mucins better than the ASGR, as suggested by *in vitro* evidence [14]). Our results do not allow weighing the importance of hepatocytes in the capture of fully soluble injected LL materials (sLL).

Part of the uptake of LL materials by KCs was observed to be Clec4F independent (Fig. 5a and Fig. 6a and b). Clec4F-independent uptake by KCs, as well as by non-KC CD11b⁺ cells and LSECs as previously mentioned, may be mediated by natural anticarbohydrate antibodies that bind the LL mucins, either directly or via complement activation (38). In the context of chronic infection, the possibilities for Clec4F-independent uptake are even broader than after LL mucin injection. In the first place, the mucins will be opsonized by specific (homologous) antibodies (7, 38). In second place, contrary to the artificially prepared (soluble and insoluble) mucin preparations, LL materials shed from live parasites must contain the major nonmucin structural component of the LL, i.e., calcium inositol hexakisphosphate (calcium InsP₆) (39–41). Calcium InsP₆ binds host C1q and initiates limited activation of complement (38, 42). In fact, the observed uptake of LL materials by phagocytes at the experimental infection site (Fig. 7a) must also be Clec4F independent, as peritoneal macrophages are not expected to express Clec4F (17). Given the ample possibilities of Clec4F-independent capture, it is noteworthy that Clec4F nonetheless has a clearly detectable role in LL material uptake (by KCs), especially in the infection context.

As mentioned, in human infections affecting solid organs, LL debris accumulate in the parasite's vicinity (11). Our results show the presence of LL materials at the experimental infection site but also, as mentioned, the capture of these materials by the liver (Fig. 7a). This implies that the accumulation of LL debris in the parasite's vicinity is moderated by the circulation and capture by the liver of materials derived from this debris. This is important because, although moderate amounts of LL particles probably have immune modulatory effects that favor the parasite, large amounts of LL particles accumulating at the infection site would probably foster inflammation (12, 13, 43, 44). Inflammation might also be brought about by the LL materials remaining in circulation and possibly being deposited in the glomeruli or other sites. Indeed, if, as we speculated above, monocytes are recruited to the liver in response to trapped LL particles, then Clec4F-dependent KC capture may be important to avoid liver inflammation. This aspect may not have been fully captured in our flow cytometry and histology experiments because of liver perfusion prior to analysis.

The events downstream of LL material capture by KCs are certainly worth studying. KCs can present antigens to T cells present in the vascular space, and this normally leads to tolerogenic responses that can have a systemic impact (23, 45, 46). The analysis of immune responses in WT and Clec4f^{-/-} mice infected with *E. granulosus* will be the subject of future communication.

Ancestrally, the larval stages of the parasites belonging to the taeniid family (includ-

FIG 7 Legend (Continued)

presence of LL-derived materials in various organs was analyzed by histology, using the E492 antibody as a probe. Images from representative mice are shown out of 15 infected and 5 control mice; the bars represent 50 μm . Black arrows indicate KC-like cells staining for LL material; empty arrowheads indicate occasional staining for LL material in spleen and lymph node. The staining observed in adipocytes (upper left-hand corner of the infected mouse mesenteric lymph node section) was also observed in adipocytes present in kidney and lung sections, irrespective of infection, and must therefore represent a cross-reaction of the antibody. No staining was observed in sections probed with the secondary reagent only. (b) The localization of LL materials in KC from infected mice was confirmed by fluorescence histology, using the E492 antibody as probe and either Clec4F or F4/80 as KC markers (original magnification, $\times 630$). The uptake of LL-derived materials by nonparenchymal liver cells of infected BALB/c mice was also analyzed by flow cytometry, using PNA as probe. (c and d) Results are shown for KCs, LSECs, and non-KC CD11b⁺ cells in terms of percentages of positive cells (c) and mean fluorescence intensities (d). (e) Representative dot plots for the three cell types are shown. The positive cell threshold was established using staining controls. (f to h) In addition, WT and Clec4f^{-/-} C57BL/6 mice were similarly infected, and the uptake of LL-derived materials was analyzed by flow cytometry and presented as for the BALB/c mice. Results in panels a to e are from a single experiment, and results in panels f to h are pooled from two independent experiments, shown in blue and red. In panels c, d, f, and g, data shown correspond to individual mice, and their median values are indicated. The statistical analyses were carried out by the modified Wilcoxon-Mann-Whitney (c and d) and Kruskal-Wallis (f and g) tests.

ing those of the genus *Echinococcus*) probably infected the liver of rodent hosts (6, 47). In this context, the interaction of materials shed by the parasites with a receptor (Clec4F) specifically expressed by phagocytic cells present in the same organ (KCs) may have been evolutionarily advantageous. This may have been so because LL material uptake by KC would have avoided particle buildup and consequent inflammation in the liver sinusoids and/or other sites and/or because KCs are poised for tolerogenic antigen presentation. The extant species *E. multilocularis* dwells almost exclusively in the liver of rodents (besides accidentally infecting humans). The LL of this species also interacts with Clec4F, as suggested by experiments using recombinant Clec4F (14) and by the presence in this species' LL of the blood antigen P₁ motif (48). Thus, host Clec4F is likely an important player in *E. multilocularis* infection.

The natural hosts of larval *E. granulosus sensu lato* are mostly ungulates, including sheep, cattle, pigs, goats, camels, and horses. Like in rodents, in ungulates, Clec4F also appears to be expressed in the liver (16). Therefore, the uptake of LL materials by KC via Clec4F probably takes place also in the ungulate natural hosts. However, in ungulates, Clec4F appears to be additionally expressed in secondary lymphoid organs (16), opening the possibility that non-KC, anatomically more widely distributed, phagocytes may act as additional sinks for LL materials. Cystic echinococcosis in ungulate hosts, although mostly caused by *E. granulosus sensu stricto*, is also caused by *Echinococcus ortleppi*, *Echinococcus canadensis*, and *Echinococcus equinus* (depending on the host species) (3). The blood antigen P₁ motif, shown in this work to be a major target of Clec4F binding to the LL, is, in all likelihood, abundant in the LL of all *E. granulosus sensu lato* species, as it is abundant in the LL of *E. multilocularis* (48). Therefore, although our data were obtained using *E. granulosus sensu stricto*, Clec4F is very probably relevant to cystic echinococcosis in ungulates irrespective of the infecting species within the *E. granulosus sensu lato* cluster.

As mentioned, humans do not express Clec4F with a functional lectin domain (16). Humans are normally a dead end for this parasite's life cycle, meaning that human *Echinococcus* infection has not been shaped through evolution. Although *E. multilocularis* infection in humans is usually accompanied by strong local inflammation (and tissue destruction), this is not clearly the case with *E. granulosus* (10, 49). It is a possibility that for *E. granulosus*, which grows more slowly than *E. multilocularis*, Clec4F-independent clearance mechanisms are, in most infection settings, sufficient to avoid excessive buildup of LL debris. It is conceivable that such Clec4F-independent mechanisms in humans include uptake via lectins expressed in KC with specificities related to Clec4F. As mentioned, the uptake of desialylated platelets by mouse KC requires Clec4F as well as MGLs or ASGR (20, 21). It seems likely that a mechanism for desialylated platelet uptake by KC based on a set of collaborating lectins exists throughout mammals, even if, in humans, such a system does not include Clec4F. Our previous screening using recombinant receptors yielded inconclusive results with respect to the capacity of human MGL and ASGR to interact with the LL mucins (14). When probing synthetic sugars, human ASGR and MGL appeared to bind less well than Clec4F to the P₁ motif (after normalizing by binding to a known target of all 3 receptors) (14). However, given the sheer abundance and significant breadth of Gal-based motifs in the LL, it cannot be ruled out that ASGR and/or MGL may be able to internalize LL materials in the absence of Clec4F. We plan to determine if KCs in liver samples from humans infected with *E. granulosus*, as well as with *E. multilocularis*, stain for LL materials using the probes introduced in this work. We also posit that the characterization of the anatomical distribution, mechanisms of cell uptake, and possible inflammatory effects of LL materials in Clec4f^{-/-} mice will provide useful insight into the biology of human cystic echinococcosis.

MATERIALS AND METHODS

Parasite materials. The starting material for LL mucin preparations, and the source of protoscoleces for experimental infections, were macroscopically healthy, *E. granulosus sensu stricto* hydatids containing live protoscoleces (i.e., fertile) from natural infections in cattle from Uruguay. Parasite samples were

genotyped by amplification and sequencing of mitochondrial cytochrome *c* oxidase according to reference 50, and all samples in the study corresponded to genotypes G1 or G3. For LL mucin preparations, hydatid walls (which, when arising from bovine hosts, have the same LL as the overwhelmingly dominant component [4, 5, 9]) were extensively washed with phosphate-buffered saline (PBS), then with 2 M NaCl, and finally with water. The walls were then dehydrated by sequential steps with ethanol (95%, vol/vol) followed by acetone and finely ground using a mortar and pestle, followed by grinding between two polished glass plates (13). The resulting fine powders were rehydrated in endotoxin-free PBS containing 30 mM EDTA (1 mL for every 2 mg dry mass) to extract the calcium inositol hexakisphosphate deposits, thus leaving the mucin meshwork as a single major structural component (4). The material was then extensively washed into endotoxin-free PBS. To obtain a fine particulate preparation (pLL), the suspension was filtered through 85- and 23- μ m gauze (13). To obtain the soluble preparation (sLL), the suspension was subjected to sonication followed by centrifugation for 1 h at $100,000 \times g$ at 4°C. To obtain sLL in which the terminal monosaccharide residues were oxidized, prior to the solubilization step, the material was treated with sodium periodate followed by sodium borohydride (or with sodium borohydride only as mock treatment) (13). For obtaining biotin-tagged sLL, prior to the solubilization step, the material in PBS was incubated overnight with *N*-hydroxysuccinimide-biotin (NHS-biotin; 10 ng per mg of LL dry mass). Sodium periodate, sodium borohydride, and/or NHS-biotin were removed by extensive washing of the particles into endotoxin-free PBS. Destruction of terminal monosaccharides by periodate was verified in terms of abrogation of the binding biotinylated PNA (27), revealed with the help of streptavidin-peroxidase, in a dot blot format. Biotin incorporation by the sLL was checked using streptavidin-peroxidase, also in dot blot format. The dry mass content of LL mucin preparations was estimated as in reference 13. LL mucin preparations were stored at 4°C in PBS with penicillin-streptomycin for no more than 6 months (pLL) or 12 months (sLL).

Clec4f^{-/-} mouse line generation. Although Clec4f^{-/-} mice had been previously generated by one of the authors' groups (17), the cost of importing the mice from Taiwan to Uruguay and rederiving them was high enough that it made *de novo* generation of a Clec4f^{-/-} line by CRISPR-Cas9 technology economically convenient. All animal procedures were performed at the specific-pathogen-free animal facility of the Laboratory Animal Biotechnology Unit of Institut Pasteur de Montevideo. Experimental protocols were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (protocol number 007-18), in agreement with National Law 18.611 and international animal care guidelines (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) (51) regarding laboratory animal protocols. Mice were housed in individually ventilated cages (Tecniplast, Milan, Italy) containing chip bedding (Toplit 6; Safe, Augy, France) in a controlled environment at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ with a relative humidity of 40 to 60% in a 14:10-h light/dark cycle. Autoclaved food (LabDiet 5K67; PMI Nutrition, IN, US) and autoclaved filtered water were administered *ad libitum*. Cytoplasmic microinjection was performed in C57BL/6J zygotes using a mix of 25 ng/ μ L Cas9 mRNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) and a 15 ng/ μ L of each single guide RNA (sgRNA; 2 guides were used) (Synthego, Menlo Park, CA, USA), diluted in standard microinjection buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.1 mM EDTA). Viable embryos were cultured overnight in M16 (Sigma, St. Louis, MO, USA) microdrops under embryo-tested mineral oil (Sigma) with 5% CO₂ in air at 37°C. The next day, 2-cell embryos were transferred into the oviduct of B6D2F1 0.5-day postcoital pseudopregnant females (20 embryos/female on average). Standard surgical procedures established in our animal facility were followed (52). For surgery, recipient females were anesthetized with a mixture of ketamine (110 mg/kg; Ketonal 50; Richmond Veterinaria S.A., Buenos Aires, Argentina) and xylazine (13 mg/kg; Seton 2%; Calier, Montevideo, Uruguay). Tolfenamic acid was administered subcutaneously (1 mg/kg; Tolfedine; Vetoquinol, Madrid, Spain) in order to provide analgesia and anti-inflammatory effects (53). Pregnancy diagnosis was determined by visual inspection by an experienced animal caretaker 2 weeks after embryo transfer, and litter size was recorded on day 7 after birth. Pups were tail biopsied and genotyped 21 days after birth, and mutant animals were maintained as founders. Gene editing efficiency was 53.8% (7 knockout [KO], 13 born pups). Genetic modification was confirmed by Sanger sequencing. The Clec4f^{-/-} line was established after producing F1, F2, and, finally, homozygous F3 animals that were used for experiments. Primers used for amplification of the genomic locus were 5'-TCTTTATGATCGCACCCACA-3' and 5'-TCCATTCTCGAGGCCATCT-3'. F1 and F2 heterozygous mice were selected using a heteroduplex mobility assay on a 10% polyacrylamide gel. In F2 mice, WT animals were differentiated from homozygous KO animals by Sanger sequencing.

Mouse experiments. WT BALB/c mice were obtained from DILAVE (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca [MGAP], Uruguay) and kept at the Instituto de Higiene animal house. Female WT (C57BL/6J) or Clec4f^{-/-} mice were bred at the Institut Pasteur de Montevideo, cohoused (so as to equilibrate their microbiota) at the Instituto de Higiene starting at 5 weeks of age for at least 3 weeks, and used between 8 and 14 weeks of age. sLL (100 or 200 μ g dry mass per mouse as indicated in each case, dissolved in 100 μ L of PBS) or vehicle only was injected into the tail vein. pLL (450 μ g dry mass per mouse, suspended in 200 μ L of PBS) or vehicle only was injected i.p. Mice were infected by i.p. injection of 2,000 (BALB/c) or 2,500 (C57BL/6) protoscoleces (viability $\geq 95\%$) suspended in 200 μ L of PBS; control mice were injected with vehicle only. Mice were euthanized using isoflurane. The procedures used were approved by the Comisión Honoraria de Experimentación Animal (La Comisión Honoraria de Experimentación Animal [CHEA], Universidad de la República, Uruguay; protocols 101900-001017-16, 101900-000994-16, 101900-000649-17, and 101900-000441-16).

Preparation of liver nonparenchymal fraction for flow cytometry. Following perfusion through the inferior vena cava with 10 mL of PBS, livers were placed in RPMI and finely chopped using a razor blade for approximately 2 min. The tissue was then digested in 5 mL per g of enzyme mix (RPMI containing 0.4 U/mL Liberase [Sigma] and 80 U/mL DNase [Sigma]) for 25 min at 37°C in an orbital shaker at 250 rpm with additional manual shaking every 5 min. Digests were added to 25 mL of cold RPMI medium, and the mix was poured through a 100- μ m strainer and centrifuged at $300 \times g$ for 5 min; the cell

pellets were resuspended in 15 mL of RPMI and again centrifuged at $300 \times g$. The pellets were suspended in 2 mL of red blood cell (RBC) lysis buffer (Sigma), and after 2 min, 2 mL of fluorescence-activated cell sorter (FACS) buffer (PBS supplemented with 0.5% bovine serum albumin [BSA] and 2 mM EDTA) was added. After another centrifugation step ($300 \times g$, 5 min), cells were resuspended in 3 mL of FACS buffer, passed through a 40- μm strainer, and counted using the Nexcelom Cellometer K2 with the AOPI stain for cell viability. Cells and buffer used with the cells were kept at 4°C except for the digestion step.

Flow cytometry. Five hundred thousand live cells were incubated with the viability probe for 10 min at room temperature and then with 0.025 μg of anti-CD16/32 (BioLegend) in 10% (vol/vol) normal rat serum (Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, Universidad de la República). Cells were then surface stained, fixed in 1% (wt/vol) paraformaldehyde (PFA) for 20 min at 4°C, washed, and permeabilized overnight with permeabilization buffer (Thermo) for intracellular staining. The details of the viability probes, antibodies, and lectin probes are given in Table S1 in the supplemental material. Finally, cells were washed, spun at $350 \times g$ for 5 min, and resuspended in FACS buffer. The data were acquired in a FACS Canto II cytometer (BD) at the Instituto de Higiene, Universidad de la República, and then analyzed using the FlowJo software package. The relative contribution of each liver nonparenchymal cell type under study to the uptake of LL materials was estimated by multiplying the frequency of cells positive for the LL probe and belonging to the particular cell type (within all live single cells) by their arithmetic mean fluorescence intensity for the probe and then dividing this figure over the summation of the analogous products for the 3 cell types analyzed.

Histology. Tissue pieces (approximately 0.5 mm³) were fixed in buffered formalin. Liver samples corresponded to animals subjected to liver perfusion with PBS (as the materials were also analyzed by flow cytometry). Paraffin-embedded tissue sections (2 μm) were probed for either chromogenic or two-color fluorescent detection. For chromogenic detection, sections were probed with biotinylated monoclonal antibody E492 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; steamer, pH 6.1) or biotinylated PNA (Vector Laboratories, Newark, CA, USA; B-1075; dilution, 1:100; steamer, pH 9.0) using the avidin-biotin complex method (54), followed by Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (Agilent, Santa Clara, California, USA) and counterstained using hemalum. For fluorescent detection, sections were probed with biotinylated monoclonal antibody E492 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; steamer, pH 6.1) alongside a monoclonal antibody either against Clec4F (clone 370901; rat IgG2a; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1:50) or against F4/80 (clone BM8; Invitrogen, Waltham, MA, USA; 1:100). The fluorochrome used for E492 labeling was Streptavidin Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1:1,600). For Clec4F and F4/80, we used polyclonal goat IgG anti-rat IgG coupled to biotin (Dianova, Hamburg, Germany; 1:100), followed by Streptavidin Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1:1,000). The counterstain was performed with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Negative controls were performed by omitting the primary antibody. Slides were evaluated in an AxioPhot microscope (Oberkochen, Germany) coupled to a charge-coupled-device (CCD) camera.

ELISA. ELISA wells were coated with sLL at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (total dry mass) in Tris-buffered saline (TBS) overnight at 4°C and blocked using TBS containing 0.05% (wt/vol) Tween 20, 1% (wt/vol) bovine serum albumin, and 0.5% (vol/vol) Carbo-Free blocking solution (Vector Laboratories). Wells were then probed with biotinylated E492 antibody (28, 55), biotinylated peanut agglutinin (PNA; Vector Laboratories), or recombinant soluble Clec4F (expressed as a fusion with the Fc fragment of human IgG₁, [56]). The biotinylated PNA or E492 antibody was detected using streptavidin coupled to peroxidase (Thermo Fisher Scientific), and the recombinant Clec4F was detected using a goat anti-human IgG coupled to peroxidase (Abcam, Cambridge, UK). For competition ELISA, recombinant Clec4F at 80 ng/mL was mixed with variable concentrations of either (biotinylated) PNA or E492 antibody as competitors, and bound Clec4F was detected as previously described.

Particle immunofluorescence. pLL particles were incubated with biotinylated E492 antibody (0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), biotinylated PNA (1:1,500), or recombinant soluble Clec4F (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), followed by streptavidin-cyanine 3 (1:500; Amersham Bioscience) or by goat anti-human IgG coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC; 1:100; Sigma), as appropriate. Control stains were included using human IgG₁ instead of recombinant Clec4F as well as omitting the primary staining reagents.

Ethics statement. Mouse studies followed the ARRIVE guidelines. Experimental protocols were individually reviewed and approved by the Institutional Animal Ethics Committees of the Institut Pasteur Montevideo or the Universidad de la República, Uruguay, as detailed in this section.

Statistical analyses. As the underlying data do not satisfy the criteria for parametric statistics, rank-based nonparametric statistical methods were used throughout. When the numbers of mice in each treatment-repeat experiment combination were equal, the Mack-Skillings exact test for a two-way layout was used (57). When the data did not fulfill the above-described condition, data from the different repeat experiments were pooled, and the modified Wilcoxon-Mann-Whitney test (only two experimental groups) (45) or the Kruskal-Wallis test (more than two experimental groups) was used. When the Mack-Skillings or the Kruskal-Wallis tests resulted in a statistic with a *P* value of less than 0.05, the test was followed by the *post hoc* multiple-comparison test described by Conover (47) and the Benjamini-Hochberg correction for controlling the false discovery rate (48). Throughout the paper, the symbols *, **, and *** represent *P* values of less than 0.05, 0.01, and 0.001, respectively.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 2 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Marcela Cucher (University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina) for advice with *Echinococcus* genotyping and to Gustavo Salinas (Universidad de la República and Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay) for helpful discussions.

We declare no conflict of interest.

This work was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII; Government of Uruguay) grant FCE 136130 (to Á.D.), CSIC I+D (Universidad de la República, Uruguay) grant number 558 (to Á.D.), MRC grant MR/L008076/1 (to S.J.J.), a travel grant (to S.J.J.) from the Science and Innovation Fund of the Foreign and Commonwealth Office (UK Government), and PEDECIBA (Government of Uruguay). A.A.B. and C.M. were supported by PhD scholarships from Comisión Académica de Posgrado (Universidad de la República, Uruguay) and ANII, respectively.

For the purpose of open access, the authors have applied a Creative Commons Attribution (CC BY) license to any Author Accepted Manuscript version arising.

A.A.B., conceptualization and investigation. C.M., L.S., L.Z., J.N., and M.S.-M., investigation. G.S., M.N.M., A.P.M., and M.C., methodology. T.-L.H., S.-L.H., and G.M.-E., resources. C.G., formal analysis (statistics). T.F.E.B. and C.C., conceptualization and supervision. S.J.J., conceptualization, funding acquisition, supervision, and writing – review & editing. Á.D., conceptualization, funding acquisition, project administration, supervision, and writing – original draft preparation.

REFERENCES

- Thompson RCA. 2017. Biology and systematics of *Echinococcus*. *Adv Parasitol* 95:65–109. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.001>.
- Díaz Á. 2017. Immunology of cystic echinococcosis (hydatid disease). *British Medical Bull* 124:121–133. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldx033>.
- Cucher MA, Macchiaroli N, Baldi G, Camicia F, Prada L, Maldonado L, Avila HG, Fox A, Gutiérrez A, Negro P, López R, Jensen O, Rosenzvit M, Kamenetzky L. 2016. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts. *Trop Med Int Health* 21:166–175. <https://doi.org/10.1111/tmi.12647>.
- Díaz A, Casaravilla C, Irigoín F, Lin G, Previato JO, Ferreira F. 2011. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol* 27:204–213. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.012>.
- Díaz A, Casaravilla C, Allen JE, Sim RB, Ferreira AM. 2011. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology. *Trends Parasitol* 27:264–273. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.01.008>.
- Díaz Á, Fernández C, Pittini Á, Seoane PI, Allen JE, Casaravilla C. 2015. The laminated layer: recent advances and insights into *Echinococcus* biology and evolution. *Exp Parasitol* 158:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.03.019>.
- Díaz A, Barrios AA, Grezzi L, Mouhape C, Jenkins SJ, Allen JE, Casaravilla C. 2023. Immunology of a unique biological structure: the *Echinococcus* laminated layer. *Protein Cell* 14:87–104. <https://doi.org/10.1093/procel/pwac023>.
- Lin G, Todeschini AR, Koizumi A, Neves JL, González H, Dematteis S, Hada N, Previato JO, Ferreira F, Moendça-Previato L, Díaz A. 2013. Further structural characterization of the *Echinococcus granulosus* laminated layer carbohydrates: the blood-antigen P1-motif gives rise to branches at different points of the O-glycan chains. *Glycobiology* 23:438–452. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws220>.
- Díaz A, Fontana EC, Todeschini AR, Soulé S, González H, Casaravilla C, Portela M, Mohana-Borges R, Mendonça-Previato L, Previato JO, Ferreira F. 2009. The major surface carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* cyst: mucin-type O-glycans decorated by novel galactose-based structures. *Biochemistry* 48:11678–11691. <https://doi.org/10.1021/bi901112q>.
- Díaz Á, Sagasti C, Casaravilla C. 2018. Granulomatous responses in larval taeniid infections. *Parasite Immunol* 40:e12523. <https://doi.org/10.1111/pim.12523>.
- Grimm J, Nell J, Hillenbrand A, Henne-Bruns D, Schmidberger J, Kratzer W, Gruener B, Graeter T, Reinehr M, Weber A, Deplazes P, Möller P, Beck A, Barth TFE. 2020. Immunohistological detection of small particles of *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* in lymph nodes is associated with enlarged lymph nodes in alveolar and cystic echinococcosis. *PLoS Negl Trop Dis* 14:e0008921. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008921>.
- Pittini Á, Martínez-Acosta YE, Casaravilla C, Seoane PI, Rückerl D, Quijano C, Allen JE, Díaz Á. 2019. Particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer inhibit CD40 upregulation in dendritic cells by interfering with Akt activation. *Infect Immun* 87:e00641-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00641-19>.
- Casaravilla C, Pittini A, Rückerl D, Seoane PI, Jenkins SJ, MacDonald AS, Ferreira AM, Allen JE, Díaz A. 2014. Unconventional maturation of dendritic cells induced by particles from the laminated layer of larval *Echinococcus granulosus*. *Infect Immun* 82:3164–3176. <https://doi.org/10.1128/IAI.01959-14>.
- Hsu T-L, Lin G, Koizumi A, Brehm K, Hada N, Chuang P-K, Wong C-H, Hsieh S-L, Díaz A. 2013. The surface carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* larva interact selectively with the rodent Kupffer cell receptor. *Mol Biochem Parasitol* 192:55–59. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.12.001>.
- Fadden AJ, Holt OJ, Drickamer K. 2003. Molecular characterization of the rat Kupffer cell glycoprotein receptor. *Glycobiology* 13:529–537. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg068>.
- Taylor ME, Snelling T, Smith DF, Drickamer K. 2019. Absence of a human ortholog of rodent Kupffer cell galactose-binding receptor encoded by the CLEC4f gene. *Glycobiology* 29:332–345. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy113>.
- Yang C-Y, Chen J-B, Tsai T-F, Tsai Y-C, Tsai C-Y, Liang P-H, Hsu T-L, Wu C-Y, Netea MG, Wong C-H, Hsieh S-L. 2013. CLEC4F is an inducible C-type lectin in F4/80-positive cells and is involved in alpha-galactosylceramide presentation in liver. *PLoS One* 8:e65070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065070>.
- Coombs PJ, Taylor ME, Drickamer K. 2006. Two categories of mammalian galactose-binding receptors distinguished by glycan array profiling. *Glycobiology* 16:1C–7C. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj126>.
- Ouyang Z, Felix J, Zhou J, Pei Y, Ma B, Hwang PM, Lemieux MJ, Gutsche I, Zheng F, Wen Y. 2020. Trimeric structure of the mouse Kupffer cell C-type lectin receptor Clec4f. *FEBS Lett* 594:189–198. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13565>.
- Jiang Y, Tang Y, Hoover C, Kondo Y, Huang D, Restagno D, Shao B, Gao L, Michael McDaniel J, Zhou M, Silasi-Mansat R, McGee S, Jiang M, Bai X, Lupu F, Ruan C, Marth JD, Wu D, Han Y, Xia L. 2021. Kupffer cell receptor CLEC4F is important for the destruction of desialylated platelets in mice. *Cell Death Differ* 28:3009–3021. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00797-w>.
- Deppermann C, Kratochil RM, Peiseler M, David BA, Zindel J, Castanheira FVES, van der Wal F, Carestia A, Jenne CN, Marth JD, Kubers P. 2020.

- Macrophage galactose lectin is critical for Kupffer cells to clear aged platelets. *J Exp Med* 217:e20190723. <https://doi.org/10.1084/jem.20190723>.
22. Li Y, Fu J, Ling Y, Yago T, McDaniel JM, Song J, Bai X, Kondo Y, Qin Y, Hoover C, McGee S, Shao B, Liu Z, Sonon R, Azadi P, Marth JD, McEver RP, Ruan C, Xia L. 2017. Sialylation on O-glycans protects platelets from clearance by liver Kupffer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:8360–8365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707662114>.
 23. Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P, Martin C, van Rooijen N, Ochando JC, Randolph GJ, Luedde T, Ginhoux F, Kurts C, Trautwein C, Tacke F. 2015. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology* 62:279–291. <https://doi.org/10.1002/hep.27793>.
 24. Rothlin CV, Carrera-Silva EA, Bosurgi L, Ghosh S. 2015. TAM receptor signaling in immune homeostasis. *Annu Rev Immunol* 33:355–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112103>.
 25. Lynch RW, Hawley CA, Pellicoro A, Bain CC, Iredale JP, Jenkins SJ. 2018. An efficient method to isolate Kupffer cells eliminating endothelial cell contamination and selective bias. *J Leukoc Biol* 104:579–586. <https://doi.org/10.1002/JLB.1TA0517-169R>.
 26. Cummings RD, Etzler ME. 2009. Antibodies and lectins in glycan analysis, p 633–647. *In* Essentials of glycobiology, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 27. Casaravilla C, Díaz A. 2010. Studies on the structural mucins of the *Echinococcus granulosus* laminated layer. *Mol Biochem Parasitol* 174:132–136. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.07.008>.
 28. Dematteis S, Piroto F, Marqués J, Nieto A, Orn A, Baz A. 2001. 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00346.x>.
 29. Walker M, Baz A, Dematteis S, Stettler M, Gottstein B, Schaller J, Hemphill A. 2004. Isolation and characterization of a secretory component of *Echinococcus multilocularis* metacystodes potentially involved in modulating the host-parasite interface. *Infect Immun* 72:527–536. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.527-536.2004>.
 30. Araj GF, Matossian RM, Frayha GJ. 1977. The host response in secondary hydatidosis of mice. I. Circulating antibodies. *Z Parasitenkd* 52:23–30. <https://doi.org/10.1007/BF00380555>.
 31. Richards KS, Arme C, Bridges JF. 1983. *Echinococcus granulosus* equinus: an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cysts. *Parasitology* 86:407–417. <https://doi.org/10.1017/s003118200050605>.
 32. Mourglia-Ettlin G, Cucher M, Arbildi P, Rosenzvit M, Dematteis S. 2016. Natural and induced antibodies contribute to differential susceptibility to secondary cystic echinococcosis of Balb/c and C57Bl/6 mice. *Immunobiology* 221:103–115. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.07.016>.
 33. Raedler A, Raedler E, Arndt R, Thiele HG. 1981. Terminal galactosyl residues of cell-surface glycoconjugates exposed on both human and murine immature T- and B-cells. *Cell Tissue Res* 218:219–226. <https://doi.org/10.1007/BF00210106>.
 34. Díaz A, Allen JE. 2007. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *Eur J Immunol* 37:3319–3326. <https://doi.org/10.1002/eji.200737765>.
 35. Wang J, Kubes P. 2016. A reservoir of mature cavity macrophages that can rapidly invade visceral organs to affect tissue repair. *Cell* 165:668–678. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.009>.
 36. Grewal PK. 2010. The Ashwell–Morell receptor. *Methods Enzymol* 479:223–241. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)79013-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)79013-3).
 37. Rensen PC, Sliedregt LA, Ferns M, Kieviet E, van Rossenberg SM, van Leeuwen SH, van Berkel TJ, Biessen EA. 2001. Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 276:37577–37584. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101786200>.
 38. Barrios AA, Grezzi L, Miles S, Mariconti M, Mourglia-Ettlin G, Seoane PI, Díaz A. 2019. Inefficient and abortive classical complement pathway activation by the calcium inositol hexakisphosphate component of the *Echinococcus granulosus* laminated layer. *Immunobiology* 224:710–719. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.05.009>.
 39. Irigoín F, Ferreira F, Fernández C, Sim RB, Díaz A. 2002. myo-Inositol hexakisphosphate is a major component of an extracellular structure in the parasitic cestode *Echinococcus granulosus*. *Biochem J* 8:297–304. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3620297>.
 40. Irigoín F, Casaravilla C, Iborra F, Sim RB, Ferreira F, Díaz A. 2004. Unique precipitation and exocytosis of a calcium salt of myo-inositol hexakisphosphate in larval *Echinococcus granulosus*. *J Cell Biochem* 93:1272–1281. <https://doi.org/10.1002/jcb.20262>.
 41. Casaravilla C, Brearley C, Soule S, Fontana C, Veiga N, Bessio MI, Ferreira F, Kremer C, Díaz A. 2006. Characterization of myo-inositol hexakisphosphate deposits from larval *Echinococcus granulosus*. *FEBS J* 273:3192–3203. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05328.x>.
 42. Irigoín F, Laich A, Ferreira AM, Fernández C, Sim RB, Díaz A. 2008. Resistance of the *Echinococcus granulosus* cyst wall to complement activation: analysis of the role of InsP₆ deposits. *Parasite Immunol* 30:354–364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01034.x>.
 43. Seoane PI, Rückerl D, Casaravilla C, Barrios AA, Pittini Á, MacDonald AS, Allen JE, Díaz A. 2016. Particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer inhibit IL-4 and growth factor-driven Akt phosphorylation and proliferative responses in macrophages. *Sci Rep* 6:39204. <https://doi.org/10.1038/srep39204>.
 44. Casaravilla C, Pittini Á, Rückerl D, Allen JE, Díaz A. 2020. Activation of the NLRP3 Inflammasome by particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer. *Infect Immun* 88:e00190-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00190-20>.
 45. Lüth S, Huber S, Schramm C, Buch T, Zander S, Stadelmann C, Brück W, Wraith DC, Herkel J, Lohse AW. 2008. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *J Clin Invest* 118:3403–3410. <https://doi.org/10.1172/JCI32132>.
 46. You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. 2008. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* 48:978–990. <https://doi.org/10.1002/hep.22395>.
 47. Hoberg EP, Jones A, Rausch RL, Eom KS, Gardner SL. 2000. A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda: Taeniidae). *J Parasitol* 86:89–98. <https://doi.org/10.2307/3284915>.
 48. del Puerto L, Rovetta R, Navatta M, Fontana C, Lin G, Moyna G, Dematteis S, Brehm K, Koziol U, Ferreira F, Díaz A. 2016. Negligible elongation of mucin glycans with Gal β 1-3 units distinguishes the laminated layer of *Echinococcus multilocularis* from that of *Echinococcus granulosus*. *Int J Parasitol* 46:311–321. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.12.009>.
 49. Basika T, Muñoz N, Casaravilla C, Irigoín F, Batthyány C, Bonilla M, Salinas G, Pacheco JP, Roth J, Durán R, Díaz A. 2012. Phagocyte-specific S100 proteins in the local response to the *Echinococcus granulosus* larva. *Parasitology* 139:271–283. <https://doi.org/10.1017/S003118201100179X>.
 50. Cucher M, Prada L, Mourglia-Ettlin G, Dematteis S, Camicia F, Asurmendi S, Rosenzvit M. 2011. Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int J Parasitol* 41:439–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.11.010>.
 51. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. National Academies Press, Washington, DC.
 52. Meikle MN, Schlapp G, Menchaca A, Crispo M. 2018. Minimum volume Spatula MVD vitrification method improves embryo survival compared to traditional slow freezing, both for in vivo and in vitro produced mice embryos. *Cryobiology* 84:77–81. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.07.005>.
 53. Schlapp G, Goyeneche L, Fernández G, Menchaca A, Crispo M. 2015. Administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid at embryo transfer improves maintenance of pregnancy and embryo survival in recipient mice. *J Assist Reprod Genet* 32:271–275. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0378-x>.
 54. Barth TFE, Herrmann TS, Tappe D, Stark L, Grüner B, Buttenschoen K, Hillenbrand A, Juchems M, Henne-Bruns D, Kern P, Seitz HM, Möller P, Rausch RL, Kern P, Deplazes P. 2012. Sensitive and specific immunohistochemical diagnosis of human alveolar echinococcosis with the monoclonal antibody Em2G11. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1877. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001877>.
 55. Baz A, Richieri A, Puglia A, Nieto A, Dematteis S. 1999. Antibody response in CD4-depleted mice after immunization or during early infection with *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol* 21:141–150. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00212.x>.
 56. Hsu T-L, Cheng S-C, Yang W-B, Chin S-W, Chen B-H, Huang M-T, Hsieh S-L, Wong C-H. 2009. Profiling carbohydrate-receptor interaction with recombinant innate immunity receptor-Fc fusion proteins. *J Biol Chem* 284:34479–34489. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065961>.
 57. Hollander M, Wolfe DE, Chicken E. 2015. Nonparametric statistical methods, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York, NY.