Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Instituto de Higiene Universidad de la República

## "Evaluación del impacto inmunosupresor de Echinococcus granulosus sobre la respuesta inmune a un antígeno modelo"

Rafael Velazco Tesina - Licenciatura en Bioquímica Facultad de Ciencias

Tutora: Cecilia Casaravilla Co-tutora: Leticia Grezzi Noviembre 2024 **Resumen.** Los parásitos helmintos co-evolucionaron con sus hospederos desarrollando mecanismos de supresión de la respuesta inmune que les permiten sobrevivir y establecer infecciones crónicas. Dichos mecanismos son diversos, y se ha demostrado que muchas veces afectan colateralmente la respuesta frente a otros antígenos y/o estímulos inflamatorios, lo que resulta ventajoso para suprimir el desarrollo de patologías en las que el sistema inmune está sobreactivado.

*Echinococcus granulosus* es el cestodo parásito que causa la equinococosis quística (hidatidosis). La larva de este parásito, conocida como hidátide, constituye una estructura unilocular rodeada por una pared cuya capa más externa es la capa laminar (CL). La CL representa la interfaz con el hospedero y la principal fuente de componentes parasitarios expuestos para la interacción con el sistema inmune. Estudios previos en ratón han mostrado que una exposición persistente del sistema inmune a partículas de CL (wpLL) inducen un entorno local inmunosuprimido, semejante al inducido durante la infección experimental. Dicho entorno se caracteriza por la presencia de macrófagos con fenotipo M2-like, con expresión de los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2, células dendríticas con alta expresión de PD-L1 y PD-L2, y expansión de linfocitos T reguladores, entre otros efectos.

En este contexto, este trabajo se propuso evaluar si el ambiente inmunosuprimido inducido tras una exposición persistente a wpLL afecta la respuesta inmune hacia un antígeno modelo, la ovoalbúmina (OVA), inyectado más tarde en condiciones inflamatorias (junto a alúmina), haciendo énfasis en la evaluación de cambios a nivel local, y la respuesta de las células T y B. Además, se planteó estudiar si wpLL podría inducir tolerancia hacia OVA al administrar el antígeno junto con el material parasitario, y luego desafiar la respuesta con OVA inyectada junto a alúmina.

En la cavidad peritoneal sólo se observaron los efectos causados por la alúmina, independientemente del condicionamiento previo con wpLL. El único efecto que evidenció la presencia previa del material parasitario fue un leve aumento en la expresión de PD-L1 en macrófagos. El estudio de la respuesta T, en bazo y nodos mesentéricos, evidenció que la respuesta *in vivo* a wpLL fue inesperadamente perdurable, y que la respuesta a OVA no se vió afectada por el condicionamiento con el material parasitario. En conjunto, los resultados mostraron que la inflamación generada por alúmina dominó la respuesta local en la cavidad peritoneal, desplazando cualquier efecto modulador atribuible a wpLL.

Contrario a lo esperado, en el experimento destinado a inducir tolerancia, la co-inyección de wpLL y OVA resultó en una producción aumentada de anticuerpos específicos contra OVA tras el desafío con alúmina, mostrando que wpLL no suprimió, sino que aparentemente favoreció la respuesta humoral en este contexto. Destaca la necesidad de explorar condiciones experimentales menos inflamatorias para evaluar mejor la capacidad inmunomoduladora de wpLL y su potencial impacto en la respuesta adaptativa del hospedero.

#### AGRADECIMIENTOS:

Agradecer el apoyo durante la tesina, a la cátedra de inmunología por recibirme e integrarme de una manera tan natural, con mención especial a la casita del medio que hizo mucho más fácil la tarea de trabajar día a día por su calidez humana. Además, una mención aún más especial al wpLL team, Ceci, Leti y Ani, que me acompañaron, enseñaron y divirtieron durante el proceso de la realización de la tesis, siempre ponderando lo humano por sobre los resultados.

Agradecer a los promiscuos y a los crocantes, que la carrera los hizo compañeros y luego la vida nos hizo amigos. Representan un bastión fundamental en este logro; gracias por las jornadas de estudio, por los almuerzos compartidos, por las visitas a la duna y por todo el cariño recibido.

Agradecer también a toda la gente hermosa que me topé en esta facultad sin dudas única, que aportaron su granito de arena en esta construcción de mi persona, ya sea con una ayuda para algún examen, por los mates compartidos, los trucos jugados o los ratitos al sol con buenas charlas de ciencias (a veces).

Agradecer sin dudas a los que siempre estuvieron: Nico, Bruno, Mati, Mate, Feli, entre otros tantos. Desde que éramos unos purretes, siempre nos acompañamos con cariño y amistad. Esto es algo que no negocio y que me llena de orgullo: ser su amigo y que cuenten conmigo

Agradecer a mi familia, que también siempre se mantuvo curiosa por entender que estaba haciendo, y siempre dando una mano cuando fue necesario.

Agradecer ni más ni menos que a mi madre, ser inigualable, extraordinariamente única, llena de amor y lucha, que me enseñó tantas cosas y caminos, pero siempre ponderando que sea yo, que sea libre y construya desde mi ser. Gracias mamá por todo, este pequeño paso para mí es tuyo.

Agradecer por último a mi viejo, tutor de mi vida, que me enseñó la riqueza que radica en el conocimiento, y por él entré en ciencias, y por él hoy soy licenciado, y por él nunca dejaré de estudiar y de intentar comprender este mundo. Se me hace injusto solo dedicarte palabras y no poder compartir con vos esto. Gracias papá, donde sea que estés, por siempre estar para mí.

## Lista de abreviaturas:

Alum: alúmina BCR: receptor de células B (del inglés, *B Cell Receptor*) BSA: seroalbúmina bovina (del inglés, Bovine Serum Albumin) DC: células dendríticas CL: capa laminar CG: capa germinativa DAMP: patrón molecular asociado a daño (del inglés, Damage Associated Molecular Pattern) EDTA: ácido etilendiaminotetraacético enzimoinmunoanálisis de "Enzyme-Linked ELISA: adsorción (del inglés, *Immunosorbent Assay")* FMO: fluorescencia menos uno (del inglés, "Fluorescence Minus One") HRP: peroxidas de rábano (del inglés, "HorseRadish Peroxidase") IFN: interferón Ig: inmunoglobulina IL : interleuquina ILC: célula linfoide innata (del inglés, Innate Lymphoid Cell) InsP6: myo-inositolhexakisfosfato ip : intraperitoneal MHC: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, Major *Histocompatibility Complex*) NK: célula asesina natural (del inglés, Natural Killer) NKT: células T asesinas naturales (del inglés, Natural Killer T cells) PAMP: patrón molecular asociado a patógenos (del inglés, Pathogen Associated *Molecular* Pattern) PBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés, *Phosphate Buffer Saline*) PEC: células del exudado peritoneal (del inglés, *Peritoneal Exudate Cells*) PRR: receptor de reconocimiento de patrones (del inglés, Pattern Recognition Receptor) SFB: Suero Fetal Bovino TCR: receptor de célula T (del inglés, *T Cell Receptor*) TGF: factor de crecimiento transformante (del inglés, *transforming growth factor*) Th: célula T colaboradora (*T*-helper) TMB: TetraMetilBencidina wpLL: suspensión de partículas de la capa laminar íntegra (del inglés, whole particles of the Laminated Layer)

## Índice:

- 1. Introducción
  - 1.1. Sistema inmune
  - 1.2. Parásitos helmintos
  - 1.3. Inmunidad contra helmintos
  - 1.4. Echinococcus granulosus
  - 1.5. Inmunidad y la hidátide
  - 1.6. Antecedentes y punto de partida
- 2. Hipótesis y objetivos

## 3. Materiales y métodos

- 3.1. Obtención de hidátides y producción de wpLL
  - 3.1.1. Obtención y procesamiento de las hidátides a partir de infecciones naturales.
  - 3.1.2. Preparación de la suspensión de partículas de la capa laminar.
- 3.2. Esquema de inoculación en ratones
- 3.3. Lavado peritoneal
- 3.4. Extracción de sangre
- 3.5. Recolección y tratamiento de bazo y nodos mesentéricos
- 3.6. Citometría de flujo
- 3.7. Cultivo celular
- 3.8. ELISA

## 4. Resultados

- 4.1. Evaluación de la capacidad del ambiente inmunosuprimido inducido por wpLL de afectar la respuesta inmune frente a un antígeno (ovoalbúmina, OVA) inyectado posteriormente en condiciones inflamatorias
  - 4.1.1. Evaluación del entorno local (cavidad peritoneal).
  - 4.1.2. Estudio de la respuesta T frente a OVA: determinación del perfil de citoquinas producidas por las células del bazo y nodos mesentéricos drenantes.
  - 4.1.3. Estudio de la respuesta B frente a OVA: medida de la producción de inmunoglobulinas específicas.
- 4.2. Evaluación de la capacidad del ambiente inmunosuprimido inducido por wpLL de generar tolerancia frente ovoalbúmina
  - 4.2.1. Estudio de la respuesta T frente a OVA: determinación del perfil de citoquinas producidas por las células del bazo y nodos mesentéricos drenantes.
  - 4.2.2. Estudio de la respuesta B frente a OVA: Medida de la producción de inmunoglobulinas específicas.
- 5. Discusión
- 6. Perspectivas
- 7. Bibliografía

## 1. Introducción

#### 1.1 Sistema inmune

La capacidad de todos los organismos de protegerse frente a la invasión por patógenos es fundamental para su supervivencia, y para ello han desarrollado diferentes mecanismos para reconocerlos y eliminarlos<sup>1</sup>.

Tradicionalmente, los mecanismos de defensa del sistema inmune se describen como organizados en tres niveles: barreras anatómicas y químicas, inmunidad innata e inmunidad adaptativa.

Las barreras anatómicas y químicas incluyen a los epitelios mucosos, la microbiota, el pH estomacal bajo, y la lisozima bacteriolítica en lágrimas, saliva y otras secreciones<sup>2,3</sup>.

El sistema inmune innato se encarga de detectar y responder frente a aquellos patógenos que logran vencer las barreras previamente mencionadas, y lo logra mediante componentes humorales (sistema del complemento, pentraxinas, colectinas entre otros<sup>4</sup>) y celulares. El sistema inmune innato celular está conformado por monocitos/macrófagos, células dendríticas (DC), mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, células asesinas naturales (NK, del inglés natural killer), células T asesinas naturales (NKT) y linfocitos innatos (ILC, del inglés innate lymphocyte cells). Algunas de estas células, como los macrófagos y DC residen en los tejidos y están preparadas para reconocer y responder a la presencia de patógenos. Para ello dependen de un repertorio limitado de receptores codificados en la línea germinal, conocidos como Pattern Recognition Receptors (PRR), que reconocen componentes conservados, compartidos por grandes grupos de patógenos, definidos como Pathogen Associated Moleculars Patterns (PAMPs). Además de los PAMPs, estas células son capaces de detectar marcadores de daño tisular que también se pueden generar durante una infección, definidos como Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs)<sup>3,5</sup>. Los PRRs pueden tener funciones relacionadas a la internalización de los patógenos por las células o a la activación de las mismas. Esto último lleva al disparo de distintas cascadas de señalización que derivan en cambios en la expresión génica, que inducen, entre otros efectos, la secreción de citoquinas y quimioquinas (moléculas de señalización solubles) que estimulan una respuesta inflamatoria que intentará contener la infección. La inflamación implica cambios en la permeabilidad de los vasos sanguíneos que irrigan al sitio, aumentando el influjo de otras células innatas al tejido, como neutrófilos, eosinófilos y monocitos, con el fin de evitar la propagación de los patógenos y finalmente eliminarlos.

El sistema inmune innato también orquesta a la respuesta adaptativa. Para ello, las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen Presenting Cells*), entre las

cuales destacan principalmente las DC, juegan un papel clave. En condiciones basales, estas células están en constante vigilancia del entorno internalizando moléculas mediante macropinocitosis y fagocitosis, para luego procesarlas y presentar sus péptidos en moléculas de MHC de tipo II (del inglés Major Histocompatibility-Complex). En un contexto inflamatorio las APC se activan, aumentando la expresión de MHC, de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (necesarias para la activación de los linfocitos T) y del quimiorreceptor CCR7 que facilita su migración hacia los nodos linfáticos drenantes. Es en los nodos linfáticos donde las DC activan y polarizan la diferenciación de los linfocitos T (LT), y, por consecuencia, determinan el tipo de respuesta adaptativa que se monta. La activación de los LT ocurre mediante la interacción entre el complejo MHC-péptido y el receptor de células T (TCR, del inglés T Cell Receptor) y entre las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y su receptor CD28 en las células T, mientras que las citoquinas secretadas por las DC determinan la diferenciación de los LT a diferentes linajes de células efectoras colaboradoras (Th, de células T helper) o reguladoras (células Treg)<sup>6</sup>. Esta serie de interacciones entre las DC y los LT constituye el principal punto de conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa y se conoce como la sinapsis inmunológica7.

Aunque todas las células T comparten el desarrollo tímico y los mecanismos de activación, existe diversidad en las funciones efectoras que se inducen según su patrón de diferenciación<sup>8</sup>. Así, los LT efectores colaboradores se pueden clasificar en  $T_H 1$ ,  $T_H 2$ ,  $T_{H}17 \text{ y} T_{H}$  foliculares<sup>6,8</sup>. Brevemente, los linfocitos  $T_{H}1$  están asociados a las respuestas de tipo 1, que combaten principalmente a patógenos intracelulares (virus, bacterias). Se caracterizan por la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que actúan activando macrófagos de forma clásica (alta actividad microbicida). Los linfocitos T<sub>H</sub>2 se vinculan con las respuestas de tipo 2, que se desencadenan típicamente en presencia de parásitos helmintos, donde predomina la producción de citoquinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, involucradas en el reclutamiento de eosinófilos y las activación alternativa de macrófagos, estos últimos con funciones reparadoras de tejidos. Los linfocitos T<sub>H</sub>17 se inducen particularmente en respuesta a bacterias extracelulares, y producen IL-17, citoquina asociada a la amplificación de la inflamación aguda en sitios de infección temprana, colaborando con la respuesta de los neutrófilos. Finalmente, los linfocitos T<sub>H</sub> foliculares (T<sub>H</sub>f) participan en la activación de los linfocitos B (LB), las otras células del sistema inmune adaptativo (ver más abajo). Por otro lado, durante la generación de la inmunidad adaptativa, se pueden inducir Treg (definidos por la expresión estable del factor de transcripción FoxP3) que cumplen un rol clave en el control de las células efectoras, particularmente mediante la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ , y la expresión de altos niveles de CD25 y CTLA-4, que determinan una fuerte competencia por la IL-2 (citoquina pro-proliferativa de LT) y la interacción con CD80/CD86, respectivamente<sup>9-11</sup>.

En forma paralela a la activación de los LT, los LB vírgenes que están circulando entre el torrente sanguíneo y los nodos linfáticos, llegan al nodo donde están los LT<sub>H</sub>f activados. Allí, los LB reconocen su antígeno específico a través del BCR y son capaces de internalizarlo, procesarlo y presentarlo a los LT<sub>H</sub>f en forma de péptidos en complejo

con moléculas de MHC-II. La interacción con los LT<sub>H</sub>f involucra la interacción péptido-MHC-II con el TCR, y la de CD40 en los LB con CD40L en los LThf, siendo esta última esencial para que los LB se activen. El resultado de la activación es la proliferación y diferenciación de los LB vírgenes a plasmoblastos (células de vida media corta productoras de anticuerpos IgM e IgG de baja afinidad), y la formación del centro germinal. El centro germinal consta de un cúmulo de LB proliferantes que además realizan hipermutación somática (mutaciones al azar en las regiones variables de los anticuerpos) y cambio de clase de su BCR (del inglés, *B Cell Receptor*), este último siendo determinado por las citoquinas producidas por los LT<sub>H</sub>f. En el centro germinal también se encuentran las células dendríticas foliculares que, junto a los LT<sub>H</sub>f, intervienen en el fenómeno de la maduración de la afinidad de los anticuerpos de los LB. Los LB que logran mejorar su afinidad se diferencian a plasmocitos (células productoras de anticuerpos de vida media larga) o a linfocitos B de memoria<sup>12</sup>. A pesar de que la respuesta adaptativa demora días en desarrollarse, una vez que lo hace genera respuestas mucho más eficientes.

Una distinción remarcable entre las células innatas y las adaptativas radica en los orígenes de sus receptores; en el sistema inmunológico adaptativo, el TCR y el BCR se generan por recombinación somática aleatoria de segmentos génicos, de manera que cada linfocito posee un receptor estructuralmente único. Dado que estos receptores no están codificados en la línea germinal, no están predestinados a reconocer ningún antígeno en particular. Más bien se genera un repertorio extremadamente diverso de receptores, y los linfocitos que portan receptores útiles se seleccionan posteriormente para la expansión clonal al encontrar los antígenos para los cuales son específicos<sup>13</sup>. Esto le brinda a la respuesta adaptativa una enorme capacidad para reconocer casi cualquier estructura antigénica, incluyendo las propias. Para evitar el reconocimiento de estructuras propias, el sistema inmune desarrolló los mecanismos de tolerancia central y periférica<sup>14,15</sup>, que aseguran la eliminación o inactivación (estado de anergia) de las células autorreactivas.

Finalmente, el sistema inmune también puede ser instruido para generar tolerancia frente a antígenos exógenos. En este contexto son claves las APCs con fenotipo tolerogénico, principalmente las DC. Las DC tolerogénicas presentan el antígeno a las células T específicas, pero no pueden entregar señales coestimuladoras o al menos no en el nivel adecuado para la activación de los LT, o incluso expresan señales co-inhibitorias, derivando en la diferenciación de células T a células T reguladoras en la periferia (pTreg)<sup>16</sup>. Las DC tolerogénicas pueden inducir pTreg mediante la producción de ácido retinoico (RA), IL-10, TGF- $\beta$ , y/o la expresión de co-inhibidores como PD-L1 y PD-L2<sup>17</sup>. El fenotipo tolerogénico de las DC puede ser inducido por componentes de patógenos involucrados en mecanismos de evasión, y/o la presencia de señales anti-inflamatorias, como IL-10 y TGF- $\beta$ <sup>18</sup>.

#### 1.2 Parásitos helmintos

Los helmintos son invertebrados triblásticos que comúnmente presentan un estilo de vida parasitaria, generalmente extracelular. Estos organismos son taxonómicamente tan diversos como sus patologías asociadas, estableciendo infecciones que pueden ser desde asintomáticas hasta de alta gravedad (ver tabla 1). Las infecciones por helmintos (helmintiasis) afectan a un tercio de la población mundial, concentrada sobre todo en regiones tropicales y sub-tropicales, donde se encuentran mayormente países en vías de desarrollo, en los que la falta de hábitos de higiene contribuye a una mayor probabilidad de encuentro entre parásito y hospedero<sup>19,20</sup>.

Las infecciones por helmintos son un problema mayor en la salud pública mundial. Se estima que 1.5 mil millones de personas en el mundo están infectadas por estos patógenos<sup>19</sup>. La extraordinaria prevalencia de las infecciones por helmintos refleja sin duda su capacidad para manipular el sistema inmunológico del hospedero, suprimiendo las respuestas que podrían provocar su expulsión. Por su parte, la inmunidad del hospedero también ha desarrollado, a lo largo de su co-evolución con los parásitos, mecanismos para limitar la patología y equilibrar mejor la susceptibilidad, la resistencia y la patogénesis inmune. Por lo tanto, las respuestas inmunes inducidas por helmintos a menudo permiten una infección continua en lugar de la eliminación completa del parásito y el daño colateral que resultaría. En otros casos, este equilibrio se altera y sobreviene una desregulación inmune y patología, como en los casos de fibrosis hepática en la esquistosomiasis<sup>21</sup>.

Especie de helminto	Enfermedad	Prevalencia mundial	Habitat del gusano adulto	
Nematodos		1	1	
Ascaris lumbricoides	Ascariasis	804 millones	Intestino	
Ascaris suum				
Trichuris trichiura	Trichuriasis	477 millones	-	
Enterobius vermicularis	Enterobiasis	>200 millones	1	
Necator americanus	Necatoriasis	472 millones		
Ancylostoma duodenale	Ancylostomiasis			
Ancylostoma ceylanicum			1	
Strongyloides stercoralis	Strongyoidiasis	30-100 millones		
Wuchereria bancrofti	<i>uchereria bancrofti</i> Fiariasis linfática		Vasos linfáticos	
Brugia malayi o Burgia Iimori				
Onchocera volvulus	Onchoceriasis	17 millones	Tejido subcutaneo	
Trichinella spiralis	Trichinellosis	0,066 millones	Intestino	
Trematodos	1	1		
Schistosoma mansoni	Schistosomiasis intestinal	206 millones	Venas mesentéricas	
Schistosoma heamatobium	Schistosomiasis urogenital			
Schistosoma japonicum	Schistosomiasis intestinal		Venas mesentéricas	
Fasciola hepatica	Fasciolasis	80 millones	Ductos biliares	
Clonorchis sinesis	Clonorchiasis		Ductos biliares y	
Opisthorchis spp.	Opisthorchiasis			
Paragonimus spp.	onimus spp. Paragonimiasis		Pulmones	
Cestodos				
Echinococcus granulosus	Hidatidosis	0,8 millones	N/A	
Echinococcus multilocularis	Echinococcosis alveolar	0,019 millones	N/A	
Cysticercus cellulosae	Cysticercosis y neurocystercosis	1 millón	N/A	
Teania solium	Teniasis intestinal	0,38 millones	Intestino	

N/A: no aplicable.

### 1.3 Inmunidad contra helmintos

Si bien se puede hacer una generalización sobre la respuesta inmune inducida por la infección con estos parásitos, se debe tener en cuenta que al ser un grupo tan extenso y diverso, cada caso puede presentar características particulares. No solo existen diferencias al considerar distintas especies, sino también al considerar a un mismo organismo, ya que los helmintos tienen ciclos de vida complejos que muchas veces involucran varios estadíos, que exponen diferentes antígenos e interaccionan diferencialmente con el sistema inmune.

Las infecciones por helmintos típicamente inducen respuestas inmunes de tipo 2. Éstas se caracterizan por la activación de células innatas como eosinófilos, basófilos y mastocitos, la activación de células  $T_H^2$  que secretan las citoquinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, y la activación de linfocitos B que favorecen la producción de IgE e IgG1 en ratón o IgG4 en humanos<sup>22</sup>. Las respuestas de tipo 2 también incluyen, particularmente en respuesta a IL-4 e IL-13, la proliferación y la activación alternativa de las poblaciones de macrófagos, que expresan característicamente la enzima arginasa-1 y los mediadores solubles Ym-1 y Relm- $\alpha$ , y se encargan de la reparación de los tejidos infectados<sup>23</sup>. No se conocen PAMPs asociados a estos patógenos; la alerta de la inmunidad innata se produce principalmente al reconocer el daño tisular causado por la migración o crecimiento de los mismos.

Se ha dilucidado que una estrategia presente en los helmintos para evadir el sistema inmune del hospedero es la capacidad de regular a la baja dicho sistema. Esta capacidad implica la inducción de células con fenotipos reguladores y/o la expansión de dichas poblaciones, como CD tolerogénicas, pTreg (productores de IL-10 y TGF-B<sup>24</sup>), linfocitos B reguladores productores también de IL-10<sup>25</sup>, y macrófagos con fenotipo M2 supresor (M2-like). Estos últimos expresan moléculas asociadas a funciones de reparación de los tejidos, pero también a la resolución de la inflamación e inmunosupresión, como los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2, que dan señales inhibitorias a los linfocitos T efectores<sup>23</sup>. Además, en diferentes modelos de estudio, se ha observado que la regulación a la baja del sistema inmune inducida por parásitos helmintos puede afectar la respuesta a otros antígenos, incluidos aquellos que se administran en vacunas, e incluso inhibir el desarrollo de desórdenes inmunológicos en los que se inducen respuestas inflamatorias exacerbadas, como alergias o diversas enfermedades autoinmunes<sup>24,26-29</sup>.

#### 1.4 Echinococcus granulosus

El género *Echinococcus* pertenece al filo platelmintos, a la clase cestoda y a la familia *taeniidae*. Dentro de este género se definen diez especies: *E. granulosus, E. equinus, E. ortleppi, E. canadensis, E. multilocularis, E. vogeli, E. oligarthrus, E. shiquicus, y E. felidis*. Actualmente las cinco primeras especies se agrupan como *E. granulosus sensu lato*<sup>30</sup>. Este conjunto de especies son las causantes de la equinococosis quística, una zoonosis

parasitaria crónica que afecta a los humanos, y puede superar los 50 casos por cada 100.000 personas por año en áreas endémicas, pudiéndose encontrar tasas de prevalencia de hasta el 5% al 10% en algunas regiones de Perú, Argentina, África oriental y China. Además, cada año, la equinococosis es responsable de la pérdida de al menos 3 mil millones de dólares, en términos de ganado y los costos para su tratamiento <sup>31–33</sup>.

La especie *E. granulosus* posee un ciclo de vida heteroxeno, es decir que necesita al menos dos hospederos para completar el ciclo. El hospedero definitivo, donde se encuentra el gusano adulto, es un mamífero carnívoro, que suele ser un cánido (por ejemplo, el perro). Por otro lado, los hospederos intermediarios, donde se desarrolla la larva, pueden ser ungulados de producción, que son presa de los hospederos definitivos. Los humanos ocupan el rol de hospederos intermediarios accidentales, que interrumpen el ciclo de vida del parásito, infectándose de manera indirecta al ingerir verduras contaminadas con fecas de perros infectados, o por el contacto estrecho con estos animales y las malas prácticas de higiene <sup>30,34</sup>.

En Uruguay la equinococosis quística presentaba uno de los niveles más altos de endemicidad hidática del mundo, sin embargo, en los primeros años del siglo XXI se logró controlar la tasa de infección mediante campañas que involucran la desparasitación de los perros de campo y el establecimiento de un régimen adecuado de prácticas higiénicas. En el último informe presentado por PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y Salud Pública Veterinaria; 2019–2021) Uruguay no reporta casos nuevos<sup>35</sup>. El último reporte fue realizado en 2018, donde se informaron 4 casos de equinococosis en humanos<sup>36</sup>.

#### 1.5 Ciclo de vida

Una vez en el intestino de su hospedero definitivo, el gusano adulto, con un estado de desarrollo maduro (lo alcanza a las 4 o 5 semanas), libera las proglótides cargadas con huevos que contienen un único embrión, definido como oncosfera. Estos huevos se liberan al lumen intestinal del hospedero y salen al medio externo con las heces, para luego ser ingeridos por el hospedero intermediario. Una vez en el tracto digestivo del hospedero intermediario, los huevos liberan las oncosferas, que migran a través de la pared intestinal y circulan por el torrente sanguíneo o linfático para llegar a órganos diana, tales como pulmón o hígado. Cada oncosfera tiene el potencial de convertirse en un metacestodo (estadío larvario), que en este género se conoce como hidátide. Dentro de la hidátide se desarrollan los protoescólices, que representan la forma infectiva del hospedero definitivo. Cuando el hospedero definitivo ingiere vísceras de ganado infectado, los protoescólices se establecen en el intestino y generan el gusano adulto, reiniciando el ciclo (ver figura 1.1). Si los protoescólices se liberan al medio interno del hospedero intermediario (por ruptura de la hidátide), también son capaces de generar nuevas hidátides, fenómeno conocido como infección secundaria<sup>37,38</sup>.



**Figura 1.1 Ciclo de vida de** *E. granulosus.* Las distintas etapas del ciclo se detallan en el texto de la figura (figura modificada a partir de <sup>37</sup>).

#### 1.6 Composición y estructura de la hidátide

En *E. granulosus*, la hidátide se desarrolla a partir de las oncosferas que llegan a los órganos internos del hospedero intermediario. Inicialmente, la hidátide se rodea de una fina capa celular (capa germinal, CG) formando una cavidad llena de líquido. La CG genera hacia el interior de la hidátide cápsulas hijas (vesículas prolígeras), que a su vez producen en su interior a los protoscoleces (por reproducción asexual), y hacia el exterior la capa laminar (CL), que constituye la interfaz entre el parásito y el hospedero (ver figura 1.2). La CL se describe como un glicocalix exacerbado, que se encuentra sólo en el género *Echinococcus*, moldeada por la presión evolutiva para mantener la integridad física de la hidátide y proteger a las células de la CG del sistema inmune del hospedero. Estas funciones las cumple permitiendo en paralelo el paso de nutrientes y productos de desecho, así como el crecimiento de los parásitos. La respuesta evolutiva a estos requisitos fue una malla hidrófila, elástica y físicamente coherente, que permite la difusión de macromoléculas de hasta al menos 150 kDa, pero protege la CG del ataque del sistema inmune<sup>39</sup>.

La CL es acelular y gruesa (alcanza los 3 mm de espesor), y está constituida por depósitos de una sal cálcica del *myo*-inositolhexakisfosfato (**InsP6.Ca**) y mucinas altamente glicosiladas con motivos ricos en galactosa<sup>40</sup>.



**Figura 1.2 Representación de la hidátide de** *E. granulosus.* Las letras a-d representan las distintas fases del desarrollo de las vesículas prolígeras. Figura obtenida y modificada de <sup>37</sup>.

Es lógico pensar que, entre los componentes de la hidátide, la CL sobresale como candidata a contribuir a los efectos inmunomoduladores del parásito. Además de representar la interfaz de contacto entre la hidátide y el sistema inmune del hospedero, representa el componente más abundante en contacto con el mismo, y su aparición durante el periodo de establecimiento del parásito coincide en el tiempo con la resolución de la inflamación que se genera al inicio de la infección<sup>41</sup>. La interacción de la CL con componentes del sistema inmune no solo ocurre en la interfaz con el hospedero; para crecer la hidátide debe romper y eliminar material de sus capas más externas, liberando partículas que podrían interaccionar y ejercer sus efectos sobre células del sistema inmune más distantes, incluso presentes en los órganos linfoides secundarios que drenan el tejido<sup>42</sup>.

#### 1.7 Inmunidad y la hidátide

Para entender correctamente la respuesta inmune que desata la hidátide, se deben tener en cuenta aspectos temporales y espaciales de la infección. En medidas temporales, la hidátide tiene la capacidad de establecer infecciones crónicas; en términos espaciales, pueden llegar a crecer hasta decenas de centímetros dentro de su hospedero secundario. Estos dos aspectos revelan la excelente capacidad del parásito de regular el sistema inmune del hospedero a favor de su supervivencia. Es remarcable que la hidátide sea capaz de resolver la respuesta inflamatoria que ocurre al inicio de la infección<sup>47</sup>. Es más, contrario a lo esperado de una infección tan voluminosa y persistente, no hay acumulación de macrófagos ni otros tipos de células inmunes en la vecindad de la hidátide, sino que ésta crece rodeada únicamente por fibras de colágeno<sup>47</sup>.

Los mecanismos por los cuales la hidátide inhibe la inflamación están en estudio. El principal modelo para estudiar este fenómeno es la infección secundaria experimental. Este modelo hace uso de la capacidad dual de desarrollo de los protoescólices de *E. granulosus*. Los protoescólices pueden generar el gusano adulto una vez en el hospedero definitivo o nuevas hidátides si se liberan al medio interno del hospedero intermediario (infección secundaria). La infección experimental consiste en la inyección intraperitoneal de ratones con protoescólices viables, con el consecuente desarrollo de hidátides en la cavidad<sup>43</sup>. La infección secundaria se puede dividir en dos etapas: una etapa temprana, en la que los protoescólices desarrollan las hidátides (establecimiento de la infección), y una etapa tardía o posterior, en la que, una vez establecidas, las hidátides comienzan a crecer (infección crónica), llegando eventualmente a desarrollar protoescólices en su interior <sup>44</sup>.

La información sobre la respuesta inmune sistémica en la equinococosis quística surge principalmente de infecciones experimentales, durante las cuales se estableció que la respuesta adaptativa efectora está sesgada a Th2 pero incluye componentes Th1<sup>26,45</sup>. Estas observaciones son concordantes con los perfiles de respuesta observados en infecciones naturales<sup>46</sup>. Además, se observó la inducción de componentes reguladores que se superponen a los efectores, como lo demuestra la expansión de células Treg y la regulación positiva de la producción de TGF- $\beta$  e IL-10 en el sitio de la infección (hígado) y en sangre<sup>47,48</sup>. Por lo tanto, al igual que otros helmintos, para sobrevivir, la larva de *E. granulosus* estimula los circuitos inhibidores inherentes al sistema inmunológico del hospedero, mitigando, por ejemplo, las respuestas efectoras de los LT<sup>49</sup>.

#### 1.8 Antecedentes del grupo y punto de partida

Dentro del Laboratorio de Inmunología, nuestro grupo estudia la hidátide de E. granulosus con el fin de comprender sus mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero. Inicialmente, se trabajó fuertemente en la caracterización de los distintos componentes de la CL<sup>50-54</sup>. Más recientemente, se generó una base de resultados significativos en entendimiento de la interacción E. el granulosus-hospedero, sustentados a partir de estudios in vitro con células primarias (macrófagos y células dendríticas)<sup>55–58</sup> e in vivo con el modelo de infección experimental crónica de ratones<sup>59</sup>. En este contexto, se estudiaron los efectos de la infección sobre diferentes componentes del sistema inmune en el sitio de infección<sup>59</sup>. Se observó un aumento en la celularidad general, particularmente en los números de eosinófilos, células T, monocitos y macrófagos. También se verificó la inducción de un ambiente inmunosuprimido, con presencia de distintas poblaciones de monocitos/macrófagos con fenotipo M2-like de tipo supresor. Este fenotipo es definido por la expresión de los marcadores Relm-a y Ym-1 (típicamente expresados en macrófagos M2), y por un aumento en los niveles de expresión de los co-inhibidores PD-L1 y PD-L2 (la expresión de estas dos últimas moléculas es la que atribuye características inmunosupresoras a las células). También se detectaron citoquinas anti-inflamatorias como TGF- $\beta$  e IL-1Ra y, por otra parte, expansión de células Treg (FoxP3+) y LT efectores PD-1+, siendo estos últimos potenciales blancos de la inhibición por PD-L1 y/o PD-L2. Finalmente, se observó que los linfocitos T locales tienen una capacidad disminuida de responder frente a un estímulo policional (anticuerpo anti-CD3), indicando que el ambiente inmunosuprimido afecta la respuesta de las células efectoras que llegan al tejido.

Teniendo en cuenta que, para crecer, la hidátide descama material de las capas superficiales de la CL<sup>60,61</sup>, el grupo de investigación puso a punto un modelo de inyecciones repetidas de partículas de la CL (wpLL, del inglés *whole particles of the Laminated Layer*) en la cavidad peritoneal de ratones, para estudiar el efecto de un encuentro persistente de las células inmunes con las mismas, logrando así imitar la forma en la que el sistema inmune interactúa con dicho material durante la infección crónica. Los resultados mostraron que este modelo reproduce fielmente los efectos observados en el modelo de infección (tesis de doctorado de Leticia Grezzi, en curso; resultados no publicados).

Estos estudios señalaron a la CL como un componente clave para el establecimiento de la inmunosupresión por el parásito. El presente trabajo busca comprender cómo el ambiente inmunosuprimido desencadenado por el modelo de inyecciones múltiples de wpLL impacta en la respuesta inmune a un antígeno modelo.

## 2. Objetivo general:

Evaluar la capacidad de la CL de la hidátide de *Echinococcus granulosus* de inhibir la respuesta inmune a un antígeno modelo como ovoalbúmina (OVA), inyectado en condiciones inmunogénicas.

### 2.1 Objetivos específicos:

- 1. Evaluar si la inducción de un entorno inmunosuprimido tras múltiples inyecciones con partículas de la CL afecta la respuesta inmune a un antígeno modelo (OVA) inyectado posteriormente en condiciones inmunogénicas (con alúmina como adyuvante).
- 2. Evaluar si el entorno inmunosuprimido inducido por las múltiples inyecciones con partículas de la CL es capaz de inducir tolerancia frente al mismo antígeno modelo (OVA), al ser co-administrado con el material parasitario.

## 3. Materiales y métodos

## 3.1 Material parasitario

#### 3.1.1 Obtención y procesamiento de las hidátides a partir de infecciones naturales

El material de trabajo se obtuvo de hidátides de *E. granulosus*, alojadas en vísceras (principalmente pulmón) de bovinos infectados naturalmente, cedidas gentilmente por frigoríficos locales (Urexport). El procesamiento de las hidátides se realizó en el laboratorio, siguiendo lo detallado en <sup>55</sup>. Brevemente, se realizó un pequeño corte en la hidátide para extraer el líquido allí presente y luego se retiró la pared colapsada, utilizando una pinza. Para seleccionar las paredes de las hidátides a utilizar se consideraron dos criterios: que se encuentren en buen estado, es decir, que su coloración sea blancuzca o levemente amarillenta, y que provengan de una hidátide fértil (con presencia de protoescólices en el líquido hidático). Las paredes de hidátides seleccionadas se conservaron a  $-20^{\circ}$ C hasta su uso.

Para determinar el genotipo de los parásitos utilizados se amplificó y secuenció la citocromo c oxidasa mitocondrial de los protoescólices de las hidátides seleccionadas, de acuerdo al protocolo planteado en <sup>62</sup>. Todos los materiales correspondieron al genotipo G1.

Para su uso como material de trabajo, las paredes almacenadas se descongelaron y se sometieron a varios lavados rápidos con solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés *Phosphate Buffer Saline*) conteniendo CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM; este último se utiliza con la finalidad de conservar el componente InsP6.Ca. Posteriormente, se realizó un lavado de 3 horas y otro de 24 horas con la misma solución. Seguido, se realizaron lavados con una solución de alta fuerza iónica, NaCl 2 M CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM, a fin de minimizar la presencia de proteínas bovinas adsorbidas a las paredes, aunque se ha demostrado que no se logran eliminar totalmente, permaneciendo adsorbida una cierta cantidad de anticuerpos del hospedero <sup>63</sup>. Por último, se realizaron varios lavados rápidos con agua destilada para remover las sales provenientes de los lavados previos, se congeló la muestra a  $-80^{\circ}$ C en un volumen mínimo de agua, y se liofilizó durante al menos 24 horas. El material liofilizado obtenido se molió utilizando un mortero, y luego se porfirinizó sobre vidrios esmerilados hasta la obtención de un pulverizado fino, que se almacenó a 4°C hasta su uso.

3.1.2 Preparación de la suspensión de partículas de la capa laminar

El protocolo de obtención de CL (ver figura 3.1) fue puesto a punto en <sup>55</sup>. La preparación de este material se realizó en condiciones de esterilidad (cabina de flujo laminar) para su posterior uso como material inyectable.

El pulverizado fino de CL se rehidrató en PBS 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> utilizando un homogeneizador Potter (lavado previamente con NaOH 0.1 M durante 18 horas, para eliminar posibles pirógenos, y luego autoclavado). La suspensión obtenida se filtró secuencialmente a través de mallas de serigrafía con un tamaño de corte aproximado de 85, 45 y 23 um. Luego, se realizaron 10 lavados con PBS 0.1 mM CaCl2 (cociente de lavado volumen/volumen 1/10), centrifugando 5 minutos a 3500 x g. La fracción obtenida fue resuspendida en PBS 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> conteniendo una mezcla de antibióticos/antimicótico (100 U/mL penicilina, 100 ug/ml estreptomicina y 0.25 ug/mL de anfotericina B). El material resultante es al que denominamos wpLL. Para determinar la masa seca de la suspensión se liofilizó una alícuota del material (ver figura 3.1).



**Figura 3.1 Esquema del procesamiento de las hidátides.** Metodología seguida para la obtención del material particulado de la capa laminar a partir de las hidátides.

#### 3.2 Experimento in vivo 01

Para evaluar si la inducción de un entorno inmunosuprimido tras múltiples invecciones con wpLL es capaz de afectar la respuesta a un antígeno modelo (OVA) inyectado posteriormente en condiciones inmunogénicas (con alúmina (Alum) como adyuvante), se utilizaron ratones C57BL/6, hembras, de 8-12 semanas de edad, y de un peso aproximado de 20 g. Estos animales fueron obtenidos del Departamento de Recursos Biológicos del DILAVE (MGAP, Uruguay) y criados en el Instituto de Higiene (UdelaR). El esquema de inmunización (representado en la figura 3.2) fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Universidad de la República, Uruguay: protocolo Nº 070151-000046-22). Los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal (ip) con 50 ug de masa seca de wpLL/invección en 200 uL de PBS 0.1 mM CaCl2, o con un volumen igual de vehículo para los ratones control (utilizando agujas de calibre 23 G). Se realizaron 5 invecciones administradas dos veces por semana, en un tiempo total de 2.5 semanas. Tras 24 horas de la última inyección se realizó el desafío, que implicó una inyección ip con 20 ug de OVA (Endograde Ovalbumin Ultra-Pure, Biovendor) y 2 mg de alúmina (Alhydrogel al 2%; Invivogen) en 200 ul de PBS, o con 2 mg de alúmina en 200 ul de PBS (también utilizando agujas 23 G). Luego de una semana se realizó la eutanasia de los animales utilizando el anestésico inhalatorio isofluorano. La respuesta inmune se evaluó a nivel local (cavidad peritoneal, cp) y sistémico (sangre, bazo y nodos linfáticos drenantes de la cp).



**Figura 3.2 Esquema de inyecciones correspondiente al experimento 01.** Se específica las cantidades de material a inyectar, días, grupos experimentales y muestras a recolectar (sangre, nodos, bazo y lavado peritoneal).

#### 3.3 Experimento in vivo o2

Para evaluar la capacidad de wpLL de inducir tolerancia frente a un antígeno modelo (OVA) co-administrado, se utilizaron ratones C57BL/6, hembras, de 8-12 semanas de edad y peso aproximado de 20 g, también obtenidos del Departamento de Recursos Biológicos del DILAVE (MGAP, Uruguay) y criados en el Instituto de Higiene (UdelaR). Siguiendo un protocolo muy similar al anterior, se realizaron 4 inyecciones de wpLL administradas dos veces por semana, en un tiempo total de 2 semanas (ver figura 3.3). Luego de 4 días de la última inyección, se realizó la co-inyección de 50 ug de masa seca de wpLL y 20 ug de OVA en 200 ul de PBS, o con un volumen igual de vehículo como control. Tras una semana se realizó el desafío, *ídem* que en el *experimento o1*. La eutanasia de los animales se realizó con isofluorano. La respuesta inmune se evaluó a nivel de la sangre y en órganos linfoides secundarios (bazo y nodos linfáticos que drenan la cp).



**Figura 3.3 Esquema de inyecciones correspondiente al experimento 02.** Se específica las cantidades de material a inyectar, días, grupos experimentales y muestras y órganos a recolectar (sangre, nodos, bazo y lavado peritoneal).

## 3.4 Lavado peritoneal

Posterior a la eutanasia de los ratones, se realizaron dos lavados peritoneales, cada uno con 5 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 0.2% v/v de suero fetal bovino (SFB), 2 g/L de bicarbonato de sodio y antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100

ug/mL de estreptomicina y 0.25 ug/mL de anfotericina B). Los tubos se centrifugaron a 350 x g por 5 minutos a 4°C. Las células de la cavidad peritoneal (PEC, por *peritoneal exudate cells*) obtenidas se suspendieron en 1 mL de medio, y se tomó una alícuota de cada muestra para determinar su cantidad utilizando el contador automático S6 *Universal Analyzer – CTL, Inmunospot.* Luego, las células se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento para análisis por citometría de flujo.

## 3.5 Citometría de flujo

Para ser analizadas por citometría de flujo, se sembraron 350 mil PEC de cada ratón por pocillo, en placas de 96 pocillos fondo en V, y se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento. Para poder determinar la viabilidad de las células, se las incubó con 10 ul/pocillo del marcador de viabilidad Live/Dead<sup>™</sup> Fixable Green Cell Stain Kit en PBS, durante 10 minutos y a temperatura ambiente. A partir de este paso, las células se mantuvieron protegidas de la luz. Luego, se bloquearon los receptores Fc con 15 ul/pocillo de 1 ug/ml de anti-CD16/CD32 (Biolegend) y suero normal de rata al 10% v/v en solución tampón de citometría (BSA al 0.5% m/v y EDTA 2 mM en PBS), durante 20 min. Luego del bloqueo, las células se incubaron con 25 ul/pocillo de una mezcla de anticuerpos conjugados a fluorocromos en solución tampón de citometría, durante 40 minutos, con la finalidad de marcar las moléculas de superficie de interés (ver tabla 2). Luego de la tinción, se realizaron dos lavados con solución tampón de citometría a 350 x g durante 5 minutos a 4°C y se fijaron con 100 ul de paraformaldehído (PFA) al 1% m/v. Por último, se realizaron dos lavados en condiciones idénticas a las descritas previamente, y las células se mantuvieron en la solución tampón de citometría a 4°C hasta su análisis en el citómetro de flujo.

Para la tinción intracelular, después de fijar con PFA y lavar las células, las mismas se permeabilizaron con 100 ul/pocillo de la solución de permeabilización (eBioscience, Thermo), durante toda la noche a 4<sup>°</sup>C. Posteriormente, las células se lavaron con solución de permeabilización, se marcaron con 50 ul/pocillo de la solución del anticuerpo anti-Ym-1 biotinilado (R&D Systems, ver Tabla 2), durante 40 minutos y se lavaron dos veces más. Por último, se incubaron con 50 ul/pocillo de estreptavidina conjugada a fluorocromo, durante 40 minutos, se lavaron dos veces, se resuspendieron en 75 ul/pocillo de solución tampón de citometría y se conservaron a 4<sup>°</sup>C hasta su análisis por el citómetro.

Para aquellas moléculas cuyo nivel de expresión en las condiciones de estudio era desconocido (Ym-1 y PD-L1), se realizaron controles FMO (*Fluorescence Minus One*). Para ello, se incubó una mezcla de células de cada grupo experimental con todos los anticuerpos empleados en la tinción, excepto aquel dirigido contra la molécula de interés. Este tipo de controles permiten corregir la superposición de los espectros de emisión entre los fluorocromos utilizados.

Las muestras se adquirieron en un citómetro FACS Canto II (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el paquete de software FlowJo. El nivel de expresión de las moléculas de interés se estimó en términos de media geométrica, como la diferencia entre la media geométrica de la intensidad de fluorescencia de las células positivas para la molécula de interés y la de las células negativas para la misma. El límite entre células positivas y negativas se estableció sobre la base de los controles (FMO).

En las Figuras 3.4 y 3.5 se muestran las estrategias de gating utilizadas en ambas tinciones.

MARCADO DE SUPERFICIE								
Marca	Clona	Anticuerpo	Fluorocromo	Dilución final	Reactivo secundario			
BioLegend	CD5	Anti-CD19	APC Cy7	1/200	-			
BioLegend	BN8	Anti-F4/80	APC Cy7	1/300	-			
BioLegend	M1/70	Anti-CD11b	BV510	1/400	-			
BioLegend	m5/114.15.2	Anti-MHCII	PerCP	1/400	-			
BioLegend	517007L	Anti-SiglecF	PE	1/200	-			
eBioscience	HK1.4	Anti-Ly6c	APC	1/200	-			
eBioscience	B20.1	Anti-TCRb	PE Cy7	1/200	-			
eBioscience	16-10a1	Anti-Ly6g	APC	1/200	-			
eBioscience	MIH5	Anti-PDL1	PE	1/200	-			

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo.

MARCADO INTRACELULAR							
Marca	Clona	Anticuerpo	Fluorocromo	Dilución final	Reactivo secundario		
RnD	IgG policlonal de cabra	Anti-Ym1-biotina	-	50 ug/mL	Estreptavidina conjugada a APC (1/200)- ebioscience (Thermo)		



**Figura 3.4 Estrategia de gating para la tinción 1.** Definición de las distintas poblaciones celulares de la cavidad peritoneal en función de la expresión de marcadores fenotípicos.



**Figura 3.5 Estrategia de gating para la tinción 2.** Definición de las poblaciones de monocitos/macrófagos de la cavidad peritoneal, para luego medir la expresión de los marcadores Ym-1 y PD-L1.

#### 3.6 Extracción de sangre

Una vez finalizado el lavado peritoneal, se realizó la extracción de sangre desde la vena cava inferior utilizando una jeringa de 1 mL con aguja calibre 27G. La sangre se dejó coagular durante 1 hora a 37°C, y toda la noche a 4°C. Luego, se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 4°C. Se recuperó el suero, y se centrifugó nuevamente para remover posibles restos de coágulos. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

## 3.7 Recolección y procesamiento de bazo y nodos linfáticos

Se extrajeron ambos órganos y se procesaron en esterilidad, tratando de mantenerlos en hielo el mayor tiempo posible. Para obtener las células en suspensión, los órganos se disgregaron entre 2 mallas de serigrafía (de 85 um de apertura de malla) inmersas en 2 mL de medio RPMI complementado con antibiótico/antimicótico (a la concentración mencionada previamente). La disgregación se realizó raspando con una pinza. Las células recuperadas se centrifugaron a 350 x g durante 5 min a 4<sup>-</sup>C. Luego de este paso, difiere el protocolo para cada órgano.

Para el bazo: se lisaron los eritrocitos mediante el agregado de 3 mL/bazo de *buffer* de cloruro de amonio (NH4Cl) 0.168 M durante 2 minutos. Luego, se diluyó el reactivo de lisis por el agregado de 30 mL de medio RPMI y las células se centrifugaron a 350 x g por 5 minutos a 4°C. Al finalizar la centrifugación, las células se suspendieron en 10 mL de medio de cultivo para determinar la concentración de células (ídem "Lavado peritoneal"), y luego suspenderlas de modo de obtener una concentración final de 2 x 10^7 células/mL en medio RPMI suplementado con SFB al 10 % (v/v), HEPES 10 mM, beta-mercaptoetanol 55 uM y una mezcla de antibiótico/antimicótico (medio de re-estimulación)

Para nodos: las células obtenidas se centrifugaron, se suspendieron en 2 mL de medio RPMI y se determinó la concentración de las mismas (ídem "Lavado peritoneal"). Finalmente, se preparó una suspensión con una concentración de 1 x 10^7 células/mL en medio de re-estimulación

## 3.8 Re-estimulación ex vivo de esplenocitos y células de nodos linfáticos

Se cultivaron 2 millones de células de bazo o 1 millón de células de nodo mesentérico por pocillo en placas *Greiner* de 96 pocillos fondo plano. Se evaluaron 2 contextos diferentes: las células cultivas en medio RPMI (control), o las células cultivadas con el estímulo de OVA a 100 ug/mL (volumen final 200 uL). Se incubaron durante 72 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO2, y luego se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C para el posterior análisis de citoquinas.

## 3.9 Cuantificación de citoquinas mediante la técnica ELISA

Las citoquinas presentes en los sobrenadantes recuperados tras la re-estimulación *ex vivo* de las células de bazo y nodo mesentérico se cuantificaron mediante ELISA. Se utilizaron *kits* comerciales (tabla 3), siguiendo las instrucciones indicadas por el

fabricante. Para IL−10, IL−13, IL−17 e IFN−γ se usó el DuoSet<sup>™</sup> ELISA System de RnD Systems. Para IL−5 se utilizó el *kit* OptEIA<sup>™</sup> de BD Biosciences.

Brevemente, se sensibilizaron placas de alta afinidad Greiner de 96 pocillos con 50 uL de anticuerpo de captura correspondiente, diluído en la solución tampón indicada por el fabricante (ver Tabla 3) durante toda la noche a 4°C. Luego, se bloquearon los pocillos con 100 ul de la solución de bloqueo adecuada (ver tabla 1), durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez bloqueados, los pocillos se incubaron con 50 ul de los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos, células de nodo o diluciones seriadas de los estándares de citoquinas, por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 C. Seguido, los pocillos se incubaron con 50 ul del anticuerpo de detección diluído en la solución tampón correspondiente (ver tabla 3), durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se incubaron con 50 ul de estreptavidina conjugada a peroxidasa, por 20 minutos a temperatura ambiente, con la placa protegida de la luz. Finalmente se realizó el revelado de la placa, para lo cual se utilizó 0.1 mg/mL tetrametilbencidina (TMB) y 0.005% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato de la enzima en una solución tampón acetato pH=5, 100 uL/pocillo. Se detuvo la reacción colorimétrica mediante el agregado de 50 uL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y luego se midió la densidad óptica a 450nm. Entre todos los pasos (excepto la detención de la reacción colorimétrica) se realizaron de 3 a 5 lavados (según las recomendaciones del fabricante) con PBS-0.05% (m/v) Tween 20.

Citoquina	AC de captura	Bloqueo	Concentración máxima del estándar (pg/mL)	AC de detección	Estreptavidina peroxidasa	Marca del kit y número del catálogo
IL-10	1/120 en PBS	1% (m/v) BSA en PBS	2000	1/60 en 1% (m/v) BSA en PBS	1/40 en 1% (m/v) BSA en PBS	R&D DY417
IL-13	1/120 en PBS	1% (m/v) BSA en PBS	4000	1/60 en 1% BSA en PBS	1/40 en 1% (m/v) BSA en PBS	R&D DY413
IL-17	1/120 en PBS	1% (m/v) BSA en PBS	1000	1/60 en 1% (m/v) BSA en PBS	1/40 en 1% (m/v) BSA en PBS	R&D DY421
IFN-Y	1/120 en PBS	1% (m/v) BSA en PBS	2000	1/60 en 0,1% (m/v) BSA, 0,05% (m/v) Tween 20 en Buffer Tris	1/40 en 0,1% (m/v) BSA, 0,05% (m/v) Tween 20 en Buffer Tris	R&D DY485
IL-5	1/250 en Buffer carbonato	10% SFB (v/v) en PBS	1000	1/250 en 10% (v/v) SFB en PBS	1/250 en 10% (v/v) SFB en PBS	BD 555236

Tabla 3. Kits de ELISA utilizados para la determinación de citoquinas.

#### 3.10 Detección de inmunoglobulinas G

A partir del suero obtenido tras el procesamiento de la sangre, se midió la presencia de inmunoglobulinas G mediante un ensayo de ELISA. Para ello, se sensibilizaron placas Greiner de alta afinidad de 96 pocillos con 50 ul de OVA a una concentración de 10 ug/mL en PBS durante toda la noche a 4°C. Luego, se bloqueó con 100 ul de 1% (m/v) BSA en PBS por 2 horas a temperatura ambiente. En los pasos subsiguientes todos los reactivos fueron diluídos en 1% (m/v) BSA en PBS, a menos que se aclare lo contrario. Posteriormente, se incubaron los pocillos con 50 ul de las distintas muestras de suero a la dilución correspondiente (ver tabla 4), durante toda la noche a 4°C. Posterior a las muestras, los pocillos se incubaron con 50 ul del anticuerpo de detección a una concentración de 0.1 ug/mL (excepto para IgG totales que la concentración fue de 0.05 ug/mL), por 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se incubaron los pocillos con 50 ul del conjugado de estreptavidina-HRP 1ug/mL (Thermo), por 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. Por último, se realizó el revelado de manera idéntica a lo ya explicitado en la sección 3.9. Entre todos los pasos (excepto la detención de la reacción colorimétrica) se realizaron de 3 a 5 lavados con PBS-0.05% (m/v) Tween 20.

Para los anticuerpos IgG totales, IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 anti-OVA se utilizaron anticuerpos policionales biotinilados de Southern Biotech, que detectan al anticuerpo en estudio, y estreptavidina-HRP (Thermo).

#### 3.11 Detección de inmunoglobulinas E totales

Para las IgE totales se realizó un ensayo de ELISA de captura. Para ello, se sensibilizaron placas Greiner de alta afinidad de 96 pocillos con 50 ul de anticuerpo de captura a una concentración de 2 ug/mL en PBS, durante toda la noche a 4°C. Luego, se bloquearon los pocillos con 100 ul de 1% (m/v) BSA en PBS, durante 2 horas a temperatura ambiente. En los pasos subsiguientes todos los reactivos fueron diluídos en 1% (m/v) BSA en PBS, a menos que se aclare lo contrario. Una vez bloqueado, se incubaron con 50 ul de las muestras de suero a las diluciones correspondientes (ver tabla 4) o con diluciones seriadas del estándar, partiendo de 2 ug/mL de IgE durante toda la noche a 4°C. Luego se incubaron los pocillos con 50 ul del anticuerpo de detección a una concentración de 2 ug/mL, por 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se incubó con 50 ul del conjugado estreptavidina–HRP a una concentración de 1 ug/mL (Thermo), por 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz y se llevó a cabo el revelado de manera idéntica a lo detallado en la sección 3.9. Entre todos los pasos (excepto la detención de la reacción colorimétrica) se realizaron de 3 a 5 lavados con PBS–0.05% (m/v) Tween 20.

**Tabla 4.** Kits de ELISA utilizados para la determinación de inmunoglobulinas anti-OVA en sangre.

Marca	Inmunoglo- bulina	Tipo de ELISA	AC captura*	Dilución inicial del suero**	Dilucion es seriadas **	AC de detección**	Conjugado**
Southern Biotech	lgG1	Indirecto		1/60	1⁄2	Anti lgG1 de ratón (origen cabra) (0,1 ug/mL)	Estreptavidina-HR P (1 ug/mL)
Southern Biotech	lgG2b	Indirecto		1/20	1/2	Anti IgG2b de ratón (origen cabra) (0,1 ug/mL)	Estreptavidina-HR P (1 ug/mL)
Southern Biotech	lgG2c	Indirecto		1/20	1⁄2	Anti IgG2c de ratón (origen cabra) (0,1 ug/mL)	Estreptavidina-HR P (1 ug/mL)
Southern Biotech	lgG3	Indirecto		1/20	1⁄2	Anti IgG3 de ratón (origen cabra) (0,1 ug/mL)	Estreptavidina-HR P (1 ug/mL)
Southern Biotech	IgG totales	Indirecto		1/100	1⁄2	Anti IgG de ratón (origen cabra) (0,05 ug/mL)	Estreptavidina-HR P (1 ug/mL)
BD Pharmingen	IgE totales	Captura	AC anti IgE de ratón (2ug/ml)	1/20	1/2	Anti IgE de ratón biotinilado (origen rata) (2ug/ml)	Estreptavidina-HR P (1 ug/mL)

\*Se utilizó PBS como disolvente.

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

#### Análisis estadístico

Se realizaron dos tipos de análisis estadísticos (*software* Graphpad Prism 8), según la cantidad de grupos experimentales. Los experimentos en los que se compararon dos grupos de ratones se analizaron aplicando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los experimentos en los que se compararon más de dos grupos de ratones se analizaron aplicando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. En aquellos casos en que este test arrojó un valor p menor a 0.05, se aplicó el post test de Dunn y se ajustaron los valores de p por multiplicidad para comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni. En todos los gráficos de esta tesis los símbolos \*, \*\*, \*\*\* y \*\*\*\* representan valores de p < a 0.05, 0.01, 0.001 y 0.0001, respectivamente.

## 4. Resultados

## 4.1 Evaluación de la capacidad del entorno inmunosuprimido inducido por wpLL de afectar la respuesta posterior a OVA inyectada en condiciones inmunogénicas (alúmina como adyuvante)

Como se describió en la introducción, la inyección intraperitoneal del material particulado de la CL logra replicar el ambiente inmunosupresor inducido por la infección experimental con hidátides de *E. granulosus*<sup>59</sup> (tesis de doctorado de L. Grezzi).

En este capítulo de la tesina evaluamos las consecuencias de condicionar la cavidad peritoneal con wpLL sobre la capacidad del sistema inmune de inducir una respuesta contra otro antígeno (ovoalbúmina, OVA) inyectado posteriormente en condiciones inflamatorias (inducidas por alúmina). Así, evaluamos las PEC, la respuesta de los linfocitos T presentes en el bazo y en los nodos linfáticos drenantes (mediante determinación del patrón de citoquinas producidos al re-estimular *in vitro* con OVA), y la respuesta de los linfocitos B (evaluada en relación al título e isotipo de los anticuerpos anti-OVA producidos).

Para la correcta comprensión de los resultados es necesario tener en cuenta las consecuencias de la inyección de OVA junto con alúmina. Cuando la alúmina se inyecta en la cavidad peritoneal causa una respuesta inflamatoria que puede ser observada en términos de la reacción de desaparición de macrófagos grandes (LPM, por *large peritoneal macrophages*) y el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos y monocitos<sup>64–66</sup>. Además, la alúmina induce la activación de las DC, aumentando su capacidad de captación de antígenos y promoviendo su migración hacia los nodos linfáticos drenantes, favoreciendo así la presentación de Ag y la inducción de una respuesta Th2 fuerte, en la que particularmente se producen anticuerpos de isotipo IgG1 e IgE<sup>64,67</sup>.

# 4.1.1 Evaluación de los efectos a nivel de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal

Analizamos los efectos sobre las PEC para evidenciar si algunas de las características del entorno inmunosuprimido inducido por las inyecciones de wpLL se mantenían luego de la inyección de alúmina, o incluso si afectaba la respuesta a este estímulo inflamatorio. Este análisis se llevó adelante mediante citometría de flujo. Las células se definieron de acuerdo a la expresión de marcadores fenotípicos: linfocitos B (CD19<sup>+</sup>), linfocitos T (TCR- $\beta^+$ ), monocitos (Ly6C<sup>+</sup>), eosinófilos (SiglecF<sup>+</sup>), neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>) y los dos principales tipos de macrófagos presentes en este tejido (descritos más adelante): LPM (F4/80<sup>high</sup> MHCII<sup>low</sup>) y SPM (por *small peritoneal macrophages*, F4/80<sup>low</sup> MHCII<sup>+</sup>). La estrategia de gating utilizada se muestra en la sección 3.5 de Materiales y

métodos. En la figura 4.2 se presentan *dot plots* representativos de cada grupo para visualizar la dinámica de las poblaciones según sus marcadores.

En primer lugar, los resultados muestran una tendencia a la baja en la cantidad de células en la cavidad peritoneal para todos los grupos que recibieron alúmina (ver figura 4.1) en comparación con el control. La disminución de células en la cavidad peritoneal se debe principalmente a la pérdida de linfocitos B y T, y de macrófagos LPM; aun a pesar de inducir el reclutamiento de nuevas células al sitio, tales como neutrófilos, monocitos y eosinófilos (ver figura 4.2 y 4.3). Vale la pena remarcar que solo en el caso de la población de eosinófilos, observamos un aumento diferencial en el número de estas células en los grupos que fueron condicionados con wpLL. Parecería que en relación a este parámetro se podrían estar sumando las respuestas a la alúmina y al material parasitario, ambos inductores de respuestas tipo 2, en las que los eosinófilos están fuertemente involucrados.



**Figura 4.1: La alúmina disminuye el número de células de la cavidad peritoneal.** Análisis de los números de células totales presentes en la cavidad peritoneal. Se muestran los resultados para los 5 lotes de ratones, que recibieron 5 inyecciones de wpLL ip, espaciadas por 3/4 días (o PBS como control), y 24 horas luego de la última inyección, una inyección intraperitoneal con PBS, alúmina (Alum) u OVA/alúmina (desafío). En el gráfico, los lotes se distinguen con colores de acuerdo a la combinación de inyecciones: PBS-PBS (gris); PBS-alúmina (azul); wpLL-alúmina (marrón); PBS-OVA/alúmina (verde); wpLL-OVA/alúmina (violeta). Se destaca la mediana de los valores obtenidos en un único experimento. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con pos-test de Dunn (\* representa valores de p < 0.05).



**Figura 4.2 Análisis de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal.** La identificación se hizo de acuerdo a la expresión de marcadores fenotípicos de cada población celular siguiendo la estrategia de gating detallada en la sección 3.5 de Materiales y métodos. Se muestran *dot plots* representativos para cada grupo de ratones.



**Figura 4.3 La alúmina altera los números de los distintos tipos celulares presentes en la cavidad peritoneal.** Análisis de los números de LT, LB, eosinófilos y neutrófilos totales presentes en la cavidad peritoneal. Se muestran los resultados para los 5 lotes de ratones, que recibieron 5 inyecciones de wpLL ip espaciadas por 3/4 días (o PBS como control), y 24 horas luego de la última inyección, una inyección intraperitoneal con PBS, alúmina (alum) u OVA/alúmina (desafío). En el gráfico los lotes se distinguen con colores de acuerdo a la combinación de inyecciones: PBS-PBS (gris); PBS-alúmina (azul); wpLL-alúmina (marrón); PBS-OVA/alúmina (verde); wpLL-OVA/alúmina (violeta). Se destaca la mediana de los valores obtenidos en un único experimento. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con pos-test de Dunn (\*\* representa valores de p < 0.01).

En cuanto a las poblaciones de macrófagos, dentro de la cavidad peritoneal se logran definir dos subgrupos principales: los LPM y los SPM. Los LPM representan el subgrupo más abundante en condiciones basales, se originan a partir de precursores embrionarios que se mantienen localmente mediante proliferación y presentan fenotipos diversos dependiendo su fenotipo de la expresión de factores de transcripción específicos inducidos por señales derivadas del tejido. En cambio, los SPM, un subgrupo minoritario en la cavidad no estimulada, se generan a partir de los monocitos circulantes, derivados de la médula ósea. En respuesta a estímulos infecciosos o inflamatorios, la proporción de estas poblaciones se altera drásticamente:

los LPM desaparecen y los SPM se convierten en la población predominante, junto con sus precursores, los monocitos recientemente reclutados desde la sangre al tejido<sup>64,68–70</sup>. La Figura 4.4 muestra que tras la inyección de la alúmina, la cantidad de LPM cae abruptamente, e inesperadamente los SPM también disminuyen.



**Figura 4.4 La alúmina induce el reclutamiento de monocitos y una caída abrupta de la población de macrófagos.** Análisis de los números de monocitos y subtipos de macrófagos totales presentes en la cavidad peritoneal. Se muestran los resultados para los 5 lotes de ratones, que recibieron 5 inyecciones de wpLL ip espaciadas por 3/4 días (o PBS como control), y 24 horas luego de la última inyección, una inyección intraperitoneal con PBS, alúmina (alum) u OVA/alúmina (desafío). En el gráfico los lotes se distinguen con colores de acuerdo a la combinación de inyecciones: PBS-PBS (gris); PBS-alúmina (azul); wpLL-alúmina (marrón); PBS-OVA/alúmina (verde); wpLL-OVA/alúmina (violeta). Se destaca la mediana de los valores obtenidos en un único experimento. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con pos-test de Dunn (\*, \*\* y \*\*\* representan valores de p < 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente).

Por otro lado, en las poblaciones de monocitos y macrófagos SPM evaluamos la expresión de Ym-1 y PD-L1, marcadores del fenotipo M2 y M2-like con sesgo supresor, respectivamente. Para ello, se realizó la estrategia de definición de las células que se muestra en la sección 3.5 de Materiales y métodos. En las Figuras 4.5 y 4.6 se muestran *dot plots* representativos de las células estudiadas para cada lote de ratones, para cada uno de los marcadores evaluados. Para cada marcador se midió el porcentaje de células que lo expresan. Para los macrófagos SPM se observa que la alúmina induce un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1, y que ese aumento es aún mayor en los grupos condicionados con wpLL.



**Figura 4.5 Evaluación de la expresión de Ym-1 en las poblaciones de monocitos y macrófagos SPM.** Se muestra un ejemplo del análisis de la expresión del marcador en los 5 lotes de ratones. En la fila superior de *dot plots* se muestran los controles FMO correspondientes a cada lote de ratones, y en la fila inferior un gráfico representativo de los resultados para cada uno de dichos lotes: PBS-PBS ; PBS-alúmina ; wpLL-alúmina ; PBS-OVA/alúmina ; wpLL-OVA/alúmina.



**Figura 4.6 Evaluación de la expresión de PD-L1 en las poblaciones de monocitos y macrófagos SPM.** Se muestra un ejemplo del análisis de la expresión del marcador en los 5 lotes de ratones. En la fila superior de *dot plots* se muestran el control FMO aplicado a todos los grupos de ratones, y en la fila inferior un gráfico representativo de los resultados para cada uno de dichos lotes PBS-PBS ; PBS-alúmina ; wpLL-alúmina ; PBS-OVA/alúmina ; wpLL-OVA/alúmina.



**Figura 4.7: El condicionamiento con wpLL aumentaría el número de SPM PD-L1+ o Ym-1+ con respecto a la inyección de alúmina.** Análisis del porcentaje de macrófagos SPM que expresan los marcadores PD-L1 y Ym-1. Se muestran los resultados para los cinco lotes de ratones, que recibieron 5 inyecciones de wpLL ip espaciadas por 3/4 días (o PBS como control), y 24 horas luego de la última inyección, una inyección intraperitoneal con PBS, alúmina (alum) u OVA/alúmina (desafío). En el gráfico los lotes se distinguen con colores de acuerdo a la combinación de inyecciones: PBS-PBS (gris); PBS-alúmina (azul); wpLL-alúmina (marrón); PBS-OVA/alúmina (verde); pLL-OVA/alúmina (violeta). Se destaca la mediana de los valores obtenidos en un único experimento. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con pos-test de Dunn (\* representa valores de p < 0.05).

De la misma manera, se analizó la expresión de Ym-1 (figura 4.7). Se destaca el aumento del porcentaje de células positivas para Ym-1 en el grupo que recibió wpLL y luego alúmina, aunque llamativamente no se observa lo mismo en el grupo condicionado con wpLL y desafiado con OVA/alum. Como los resultados corresponden a un experimento único sería importante repetirlo y confirmar que se produce este fenómeno.

# 4.1.2 Evaluación de la respuesta de las células T a nivel de bazo y nodo mesentéricos

A partir de la extracción de bazos y nodos de cada ratón, se obtuvieron las células y se incubaron *in vitro* en presencia de medio de cultivo u OVA, por 72 horas. Luego se analizó el patrón de citoquinas producido en los sobrenadantes de cultivo. Las células cultivadas en medio, sin estímulo adicional, brindan información sobre el estado en el que se encontraban las células en el tejido en el momento de la extracción, tras la estimulación *in vivo*. Las células re-estimuladas *ex vivo* con OVA brindan información sobre la polarización de su respuesta ante un nuevo contacto con el antígeno.

A nivel del bazo observamos que, cuando las células son cultivadas solo con medio de cultivo, únicamente aquellas provenientes de ratones condicionados con wpLL producen citoquinas, específicamente las asociadas a la respuesta Th2: IL-5, IL-13 e IL-10 (ver Figura 4.8). Por otro lado, al re-estimular con OVA a los esplenocitos

provenientes de los ratones condicionados con PBS o wpLL y luego inyectados con alúmina (sin OVA), responden igual que las células incubadas con medio. Esto parece indicar que la re-estimulación con OVA para estos grupos es irrelevante, es decir, la producción de citoquinas es consecuencia de la exposición a wpLL *in vivo*, que se mantiene por al menos 7 días posterior a la última inyección con el material parasitario. Por su parte, como era esperable, las células correspondientes a los ratones del grupo condicionado con PBS y desafiado con OVA/Alum, que no producían estas citoquinas al ser incubadas en medio, sí lo hacen en respuesta a la re-estimulación específica con OVA. Finalmente, los resultados observados en el caso de las células del grupo de ratones condicionado con wpLL y desafiado con OVA/Alum, sugieren que el condicionamiento con wpLL no afecta negativamente la respuesta T a OVA, y que existe una suma de la producción de citoquinas inducida en respuesta a cada uno de los antígenos (wpLL y OVA).

También se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17, citoquinas asociadas a las respuesta Th1 y Th17 respectivamente, pero no fueron detectadas en ninguna de las condiciones (resultados no mostrados).

En cuanto a la evaluación de la respuesta de las células de los nodos linfáticos mesentéricos, a pesar de que se observaron diferencias cuantitativas con respecto a la respuesta de las células de bazo, se determinó el mismo patrón de respuesta, incluso en términos de la aditividad en la producción de las citoquinas asociadas a la respuesta Th2 para cada uno de los antígenos (ver figura 4.9). De igual manera, en ninguna de las condiciones observamos producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  (resultados no mostrados).



**Figura 4.8: La respuesta de los linfocitos T de bazo inducida por wpLL persiste en el tiempo, sin afectar la respuesta a OVA.** Análisis de la respuesta de las células T de bazo. Se midió la concentración de las citoquinas producidas por los esplenocitos luego de la incubación con medio (gráficos con fondo naranja) o la re-estimulación con OVA (gráficos con fondo lila). Se muestran los resultados del análisis de IL-13, IL-5 e IL-10 para los 5 lotes de ratones que recibieron 5 inyecciones intraperitoneales de wpLL espaciadas por 3/4 días (o PBS como control), y 24 horas luego de la última inyección, una inyección intraperitoneal con PBS, alúmina (alum) u OVA/alúmina (desafío). En el gráfico los lotes se distinguen con colores de acuerdo a la combinación de inyecciones: PBS-PBS (gris); PBS-alúmina (azul); wpLL-alúmina (marrón); PBS-OVA/alúmina (verde); pLL-OVA/alúmina (violeta). Se destaca la mediana de los valores obtenidos en un único experimento. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con pos-test de Dunn (\* y \*\* representan valores de p < 0.05 y 0.01, respectivamente).



**Figura 4.9: La respuesta inducida por wpLL en los linfocitos T de nodo mesentérico persiste en el tiempo, sin afectar la respuesta a OVA.** Análisis de la concentración de citoquinas producidas por las células de los nodos mesentéricos luego de la incubación con medio (gráficos con fondo naranja) o la re-estimulación con OVA (gráficos con fondo lila). Se muestran los resultados del análisis de IL-13, IL-5 e IL-10 para los 5 lotes de ratones, que recibieron 5 inyecciones intraperitoneales de wpLL espaciadas por 3/4 días (o PBS como control), y 24 horas luego de la última inyección, una inyección intraperitoneal con PBS, alúmina (alum) u OVA/alúmina (desafío). En el gráfico los lotes se distinguen con colores de acuerdo a la combinación de inyecciones: PBS-PBS (gris); PBS-alúmina (azul); wpLL-alúmina (marrón); PBS-OVA/alúmina (verde); pLL-OVA/alúmina (violeta). Se destaca la mediana de los valores obtenidos en un único experimento. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con pos-test de Dunn (\* y \*\* representan valores de p < 0.05 y 0.01, respectivamente).

4.1.3 Evaluación de la respuesta de células B: producción de anticuerpos específicos contra OVA

A partir del suero de cada ratón, analizamos la respuesta de anticuerpos IgG y de sus diferentes subclases (IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3) específicos contra OVA y la concentración de IgE totales.

Para evaluar la respuesta de IgG y sus subtipos en el ELISA se realizaron 8 diluciones seriadas de cada muestra de suero (ver tabla 4). Para comparar la respuesta entre los diferentes grupos de ratones y obtener los gráficos correspondientes, se eligió contrastar los valores de absorbancia a la dilución que evidenciara más claramente la diferencia entre los grupos control y tratado.

Para evaluar la producción de IgE, realizamos un ensayo para determinar la concentración de anticuerpos totales de este isotipo en suero y no los específicos contra OVA. Esto se debe a que en un ELISA para determinar el título de IgE específica, al estar estas inmunoglobulinas menos representadas en el suero, los valores obtenidos podrían estar subestimados debido a la competencia de las IgG (mayoritarias) por la unión al antígeno adsorbido a la placa. Por otro lado, las IgE se encuentran normalmente en muy baja concentración en sangre por lo que ,en nuestros experimentos, un aumento en la cantidad de IgE total, sería indicativo de la producción de las mismas en respuesta a la inyección de OVA o los antígenos presentes en wpLL.

En la Figura 4.10 se muestran los resultados del análisis de los sueros. Se representan los dos grupos que fueron desafiados con OVA/alum: el condicionado con PBS y el condicionado con wpLL. Al analizar la IgG y las subclases correspondientes observamos una tendencia (sin sustento estadístico) a que el condicionamiento con wpLL disminuye la producción de IgG y sus subtipos, exceptuando la IgG3. En contraparte, cuando analizamos la concentración de IgE totales no podemos extraer ningún resultado concluyente, ya que los valores presentan una dispersión muy grande, repartiéndose en dos conjuntos extremos.

El análisis de los sueros de los ratones que no fueron desafiados con OVA no se muestra debido a que, como era esperable, no detectamos la presencia de anticuerpos contra este antígeno para ninguno de los isotipos. De igual manera tampoco detectamos producción de IgE en estos grupos. Esta última observación indica que a pesar de que wpLL induce una respuesta Th2, no se induce una respuesta detectable de anticuerpos IgE contra el mismo.



**Figura 4.10 El condicionamiento con wpLL afectaría negativamente la respuesta de anticuerpos IgG anti-OVA.** Comparación de la respuesta de anticuerpos IgE, IgG, y los subtipos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3, por ELISA. En cada gráfico se muestra el valor de la densidad óptica (DO) a la dilución de suero seleccionada para la comparación (detallada en el subtítulo de cada gráfico), excepto para IgE totales, que se cuantificaron en forma absoluta (pg/mL). Se muestran los resultados para 3 de los 5 lotes totales de ratones, que recibieron 5 inyecciones intraperitoneales de wpLL espaciadas por 3/4 días (o PBS como control), y 24 horas luego de la última inyección, una inyección intraperitoneal con PBS u OVA/alúmina (desafío). En el gráfico los lotes de ratones se distinguen con colores de acuerdo a la combinación de inyecciones: PBS-PBS (gris); PBS-OVA/alúmina (verde); wpLL-OVA/alúmina (violeta). Los resultados provienen de un único experimento. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn; no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

# 4.2 Evaluación de la capacidad del entorno inmunosuprimido inducido por wpLL de inducir tolerancia frente a un antígeno modelo (OVA) co-administrado

En este segundo objetivo, evaluamos si el ambiente inmunosuprimido inducido por las múltiples inyecciones de wpLL, en el que se sumó OVA a la última dosis del material parasitario, determinaba la generación de tolerancia al antígeno, que se evaluaría más tarde, al inyectar OVA en condiciones inmunogénicas. Si hubiera inducción de tolerancia, se debería promover la diferenciación de linfocitos pTreg, que en un segundo encuentro con el antígeno limitarían la activación de los LT efectores. En esta tesina, para evaluar la generación de tolerancia frente a OVA luego de llevar adelante el esquema de inyecciones detallado en la figura 3.3 de Materiales y métodos, analizamos la capacidad de respuesta de los LT presentes en el bazo y los nodos linfáticos drenantes, evaluando los niveles de citoquinas producidas al re-estimular *in vitro* con OVA. Además, evaluamos la respuesta de los linfocitos B mediante la cuantificación de los anticuerpos anti-OVA en suero.

# 4.2.1 Evaluación de la respuesta de las células T a nivel de bazo y nodo mesentéricos

Se siguió el mismo procedimiento que para el experimento anterior. Los resultados obtenidos muestran el mismo patrón de producción de citoquinas que observamos previamente: para las células mantenidas en medio, en el grupo condicionado con PBS no se detectó producción de citoquinas, mientras que en el grupo condicionado con wpLL si hay producción de IL-5, IL-13 e IL-10, lo que reafirma que hay una respuesta a wpLL que se mantiene por días. Por otro lado, las células de los ratones re-estimulados con OVA produjeron una respuesta polarizada a Th2, con niveles más altos de producción en aquellas provenientes del grupo condicionado con wpLL, lo que sugiere nuevamente un comportamiento aditivo de la respuesta causada por wpLL a la de la OVA/alum (ver figura 4.11).

El análisis del patrón de expresión de citoquinas en las células de los nodos mesentéricos muestra una producción similar a lo que sucede en bazo, solo que en menor cantidad. Además difiere en que en el grupo condicionado con PBS, al ser re-estimulado con OVA no se detecta ninguna citoquina (ver figura 4.12).

![](_page_40_Figure_0.jpeg)

**Figura 4.11. La respuesta inducida por wpLL en los linfocitos T del bazo persiste en el tiempo, sin afectar la respuesta a OVA.** Determinación de la concentración de citoquinas producidas por esplenocitos luego de la incubación con medio (porción de gráfico con fondo naranja) o re-estimuladas con OVA (porción de gráfico con fondo violeta). Se muestran los resultados para los 2 lotes de ratones que recibieron 4 inyecciones ip de wpLL espaciadas por 3/4 días (o PBS como control), una co-inyección ip con wpLL y OVA 4 días más tarde, y finalmente una inyección ip con OVA/Alum (desafío) 7 días después de la co-inyección. En el gráfico los lotes se distinguen con colores de acuerdo a la combinación de inyecciones: PBS-PBS/OVA-OVA/alúmina (verde); wpLL-wpLL/OVA-OVA/alúmina (violeta). Se destaca la mediana de los valores obtenidos en un único experimento. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con pos-test de Dunn (\*\* y \*\*\* representan valores de p < 0.01 y 0.001, respectivamente).

![](_page_41_Figure_0.jpeg)

**Figura 4.12. La respuesta inducida por wpLL en los linfocitos T del nodo mesentérico persiste en el tiempo, sin afectar la respuesta a OVA.** Análisis de la concentración de citoquinas producidas por las células de nodos mesentéricos luego de la incubación con medio (porción de gráfico con fondo naranja) o la re-estimulación con OVA (porción de gráfico con fondo violeta). Se muestran los resultados para los 2 lotes de ratones que recibieron 4 inyecciones ip de wpLL espaciadas por 3/4 días (o PBS como control), una co-inyección ip con wpLL y OVA 4 días más tarde, y finalmente una inyección ip con OVA/alúmina (desafío) 7 días después de la co-inyección. En el gráfico los lotes se distinguen con colores de acuerdo a la combinación de inyecciones: PBS-PBS/OVA-OVA/alúmina (verde); wpLL-wpLL/OVA-OVA/alúmina (violeta). Se destaca la mediana de los valores obtenidos en un único experimento. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con pos-test de Dunn (\* representa valores de p < 0,05).

## 4.2.2 Evaluación de la respuesta de células B: producción de anticuerpos específicos contra OVA

Para el análisis de los anticuerpos se siguió el mismo procedimiento y análisis que para el experimento anterior. En este ensayo, los resultados no se asemejan a los de dicho experimento, sino que se observa un aumento estadísticamente significativo en la producción de anticuerpos de los ratones condicionados con wpLL, tanto para IgG totales como para IgG1 específicos para OVA (ver figura 4.13).

![](_page_43_Figure_0.jpeg)

**Figura 4.13. El condicionamiento con wpLL parece favorecer la respuesta de anticuerpos específica para OVA.** Comparación de la respuesta de anticuerpos IgE, IgG, y los subtipos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3, por ELISA. En cada gráfico se muestra el valor de la densidad óptica (DO) a la dilución de suero seleccionada para la comparación (detallada en la parte superior de cada gráfico), excepto para IgE totales, que se cuantificó en forma absoluta (pg/mL). Se muestran los resultados para los 2 lotes de ratones que recibieron 4 inyecciones ip de wpLL espaciadas por 3/4 días (o PBS como control), una co-inyección ip con wpLL y OVA 4 días más tarde, y finalmente una inyección ip con OVA/alúmina (desafío) 7 días después que la co-inyección. En el gráfico los lotes se distinguen con colores de acuerdo a la combinación de inyecciones: PBS-PBS/OVA-OVA/alúmina (verde); wpLL-wpLL/OVA-OVA/alúmina (violeta). Se destaca la mediana de los valores obtenidos en un único experimento. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney (\*\* representa valores de p < 0.01).

## 5. Discusión

En los últimos 20 años, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en la caracterización de los componentes de la hidátide de *Echinococcus granulosus* y el estudio de sus mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero, particularmente en relación a su interacción con células del sistema inmune innato, como macrófagos y  $CD^{55-59}$ . Más recientemente, el grupo determinó que una exposición persistente con una preparación de partículas de la CL (inyecciones múltiples de wpLL) en la cavidad peritoneal replica el ambiente inmunosuprimido inducido localmente en infecciones experimentales<sup>59</sup> (resultados de la tesis doctoral en curso de L. Grezzi). En ambos casos, se observó la presencia de poblaciones de monocitos/macrofágos con fenotipos M2-like de tipo supresor (y también células dendríticas con este fenotipo, tesina de Analía Oleggini), expansión de poblaciones de linfocitos Treg y LT efectores CD4+PD-1+, y presencia de citoquinas anti-inflamatorias como TGF- $\beta$  e IL-1Ra, destacando así la contribución crucial de los componentes de la CL a la inmunosupresión.

Distintos grupos de investigación trabajando en el área de la inmunología de las infecciones por helmintos han demostrado que estos parásitos, e incluso sus componentes purificados, al inhibir la respuesta inmune como forma de evasión, también afectan la capacidad del sistema de responder frente a otros antígenos<sup>24,26–29</sup>. Teniendo esto en consideración, en este trabajo nos preguntamos qué sucede en el escenario de la inmunosupresión inducida por wpLL. Paralelamente, el grupo comenzó un proyecto que pretende evaluar la capacidad inmunosupresora de wpLL sobre la respuesta inflamatoria en el modelo de asma alérgico en ratón. Este modelo consta de una sensibilización al antígeno (OVA), inyectado vía intraperitoneal en alúmina, y luego desafíos intranasales con OVA para provocar el asma alérgico. Teniendo en cuenta estos planteos y los estímulos que implican, como primer objetivo de este proyecto quisimos evaluar si el condicionamiento de la cavidad peritoneal con wpLL era capaz de afectar la respuesta a OVA, inyectada junto a alúmina como estímulo inflamatorio.

Por otro lado, también nos planteamos evaluar la capacidad del ambiente inmunosuprimido inducido por wpLL de generar tolerancia frente al mismo antígeno OVA, llevando adelante una estrategia de inmunización en la que el sistema inmune se enfrenta a OVA por primera vez en el entorno condicionado con wpLL (en ausencia de las señales inflamatorias aportadas por la alúmina), para luego evaluar si este reconocimiento inicial genera tolerancia frente al antígeno inyectado posteriormente en condiciones de inflamación (junto a alúmina).

Es importante resaltar que, ambos experimentos se realizaron una única vez y, por tanto, deberían ser repetidos para concluir con mayor certeza particularmente para aquellos resultados en los que se observan tendencias que no alcanzan significancia estadística.

#### Experimento 01

El análisis de las células de la cavidad peritoneal luego de condicionar el tejido con wpLL (o PBS como control) y posteriormente desafiar con OVA en alúmina (o solo control). muestra que administración alúmina como la de alúmina, independientemente de la combinación con OVA, induce el reclutamiento de neutrófilos, monocitos y eosinófilos desde la sangre, lo que indica un proceso inflamatorio agudo, que aparentemente no se vió afectado por el condicionamiento previo con wpLL. De acuerdo con esto, si se pone foco en el estado de las poblaciones de macrófagos en la cavidad peritoneal, observamos que la alúmina provocó la desaparición completa de los LPM y una caída en el número de los SPM, en comparación con el control. Normalmente, la reacción de desaparición de LPM de la cavidad peritoneal ocurre en los primeros días luego de la inyección de un estímulo inflamatorio<sup>69</sup>, principalmente por muerte celular y reclutamiento y adhesión de las células a mesotelios dañados, pero luego de una semana sería esperable que dicha población se recuperara<sup>71</sup>, o al menos parcialmente. Llamativamente, los resultados de este trabajo muestran que luego de una semana de la inyección de alúmina no existen indicios de dicha recuperación. La escasez de reportes en la literatura previa sobre el comportamiento de los LPM en respuesta a la alúmina, estudios que no se extienden más allá de las 24 horas pos-inyección<sup>64</sup>, no permite contrastar nuestros resultados a los obtenidos por otros grupos. También resultó llamativa la disminución en el número de SPM en la cavidad, ya que se ha reportado que cuando la cavidad se enfrenta a estímulos inflamatorios, como tioglicolato o zymosan, ocurre un aumento importante en el números de éstas células que se sostiene al menos 96 horas post-inyección<sup>68,69</sup>. De esto se interpreta que la respuesta inflamatoria inducida por la alúmina en estas condiciones (particularmente a la dosis utilizada) es muy fuerte. Es probable entonces que en estás condiciones los efectos de la alúmina se havan impuesto fuertemente sobre la inmunosupresión local inducida por wpLL.

Estas observaciones sobre la dinámica de las poblaciones de la cavidad peritoneal nos llevaron a realizar otro ensayo en el que analizamos los cambios inducidos por la alúmina en la cavidad a tiempos pos-inyección más largos. Los resultados de dicho experimento no forman parte de esta tesina, pero vale la pena mencionar que mostraron que el estado basal de la cavidad peritoneal solo se comienza a recuperar luego de 25 días post-inyección de alúmina.

En conjunto, estos resultados, indican que la dosis de alúmina que se utiliza normalmente en ensayos de inmunización son de un potencial inflamatorio extremadamente fuerte, perdurando sus efectos locales durante un tiempo importante. De estos resultados emerge la idea de repetir los experimentos de este trabajo con dosis más bajas de alúmina, representando un contexto menos dominante para que las inyecciones múltiples de wpLL puedan ejercer sus efectos. De acuerdo con esto, Gorman et al<sup>72</sup> demostraron que el modelo de asma alérgico en ratón es igualmente efectivo si se usa una dosis 10 veces más baja de alúmina, sugiriendo que la dosis de uso normal de este adyuvante en inmunizaciones podría ser innecesariamente alta, y quizás por ello cause una respuesta inflamatoria que demora más de un mes en resolverse (de acuerdo a los datos que obtuvimos recientemente).

Más allá de estos resultados, es interesante resaltar que al analizar la expresión del co-inhibidor PD-L1 en la población de SPM, vemos una tendencia a un aumento en el porcentaje de SPM que expresan PD-L1 en los grupos condicionados con wpLL y luego inyectados con alúmina, en comparación con los inyectados con PBS y luego inyectados con alúmina. Esto sugiere que este aumento en el nivel de expresión del co-inhibidor es promovida por la exposición a wpLL, y se mantiene luego de la inyección de alúmina. Sin embargo, el incremento fue leve y no se obtuvo significancia estadística. Dado que los SPM son la única población remanente de macrófagos en la cavidad, habría sido útil evaluar también los niveles de expresión de PD-L2, ya que esta molécula es expresada particularmente por los macrófagos derivados de monocitos en un contexto de infección por helmintos<sup>71</sup>, y su expresión se vio aumentada en los ensayos de inyecciones múltiples con wpLL llevados adelante en la tesis doctoral de Leticia Grezzi. Por su parte, en dichos ensayos, los LPM aparecen como una de las principales poblaciones celulares que aumentan los niveles de PD-L1 en respuesta al material parasitario, sin embargo, en este trabajo la desaparición de los LPM no permitió analizar el nivel de expresión de esta molécula.

En cuanto a la respuesta de los linfocitos T en bazo y nodos mesentéricos, esperábamos que fuera afectada como consecuencia de la inmunosupresión local inducida por wpLL. Considerábamos que las DC locales condicionadas por wpLL, expresando altos niveles de PD-L1 y/o PD-L2 (Oleggini, tesina de grado) y presentes en un ambiente rico en citoquinas anti-inflamatorias como TGF- $\beta$ , al encontrarse a OVA (aun en presencia de las señales inflamatorias inducidas por la alúmina), verían afectado su fenotipo activador de la respuesta adaptativa. Así, al internalizar el antígeno y viajar a los órganos linfoides secundarios, darían señales a los LT, ya sea para inducir la diferenciación de linfocitos pTreg, o limitar la activación de las células Th2. Los resultados muestran que en las condiciones de nuestros experimentos esto no estaría ocurriendo, posiblemente por ser tan fuertes las señales inflamatorias de la alúmina que revierten los efectos de wpLL. De hecho, los resultados muestran que el condicionamiento con wpLL no afectó la respuesta específica frente a OVA, ya que, al re-estimular in vitro las células con dicho antígeno, los LT fueron capaces de responder produciendo niveles normales de citoquinas Th2. Más aún, se logra observar una sumatoria en la producción de citoquinas inducidas en respuesta a OVA y los antígenos presentes en wpLL, lo que sugiere que se están montando respuestas independientes frente a ambos materiales, que no se afectan entre sí.

Que ambos compuestos, wpLL y alúmina, promuevan una respuesta Th2 agrega un grado extra de dificultad a la hora de analizar los resultados. En el diseño de los

ensayos de este trabajo elegimos en un principio evaluar la capacidad de wpLL de afectar la respuesta a OVA/alúmina por ser el estímulo que está implicado en el modelo de asma alérgico. Resultará interesante evaluar en el futuro estímulos en los que los antígenos sean presentados en contextos Th1, que pensamos hará más fácil la lectura de los eventuales efectos.

Vale la pena destacar la persistencia de la respuesta de los linfocitos T contra wpLL en los bazos y nodos. Esto se puede deber a que las partículas de wpLL no puedan ser degradadas y eliminadas del organismo fácilmente. Por ejemplo, muchas de las partículas presentes en la preparación pueden llegar a tener un gran tamaño en relación al tamaño de las células, lo que dificulta su internalización y degradación por parte de células fagocíticas, llevando a una persistencia local y una activación de LT prolongada.

Finalmente, en relación a la producción de anticuerpos, los resultados revelaron una tendencia a la baja en los títulos de IgG anti-OVA en los grupos previamente expuestos a wpLL en comparación con los controles, sugiriendo que wpLL podría estar ejerciendo un efecto modulador de la respuesta humoral anti-OVA. Este efecto no alcanzó significancia estadística, lo cual limita las interpretaciones y subraya la necesidad de estudios adicionales.

#### Experimento 02

El objetivo de este experimento era evaluar la posibilidad de que el ambiente inmunosuprimido inducido por wpLL lograra generar tolerancia frente a OVA, al ser presentado el antígeno por CDs con baja expresión de señales coestimuladoras y alta expresión de señales co-inhibitorias. Los resultados obtenidos no apoyaron esta hipótesis, sino que fueron opuestos a lo que se esperaba. El condicionamiento de la cavidad peritoneal con wpLL, y la inyección de OVA junto a wpLL en este contexto (siendo ésta la primera vez que el sistema inmune se enfrentaba al antígeno), no solo no indujo tolerancia a OVA, sino que pareció favorecer la respuesta frente al antígeno, al menos en términos de la producción de anticuerpos. Los resultados de este experimento sugieren que en el ambiente generado por las inyecciones múltiples de wpLL, OVA habría sido presentada a los LT de manera convencional.

## 6. Conclusiones.

Se concluye que el condicionamiento con inyecciones múltiples de wpLL no afecta ni modula la respuesta a OVA inyectada en un contexto inflamatorio (presencia de alúmina), ni induce tolerancia frente al antígeno cuando este es inyectado por primera vez en el ambiente inmunosuprimido establecido luego de las inyecciones de wpLL.

Como reflexión personal, quiero destacar la complejidad inherente al estudio realizado. Estudiar la respuesta inmune frente a un antígeno implica considerar varios niveles de organización: tejidos, células, componentes humorales y vías de señalización, lo que añade complejidad al análisis y la interpretación de los resultados. En este trabajo, el desafío se amplificó por el análisis de poblaciones celulares y moléculas en las que no observamos cambios significativos particularmente por cómo fueron diseñados los experimentos, al haber utilizado una dosis de alúmina que induce una respuesta inflamatoria extremadamente fuerte. La escasez de literatura previa sobre los efectos de distintas dosis de la alúmina o sus efectos a largo plazo tampoco facilitó la tarea. Consecuentemente, no pudimos confirmar ni descartar nuestras hipótesis iniciales. Este proceso ha sido una constante recordatorio de lo complejo y sensible que es el sistema inmune y de los desafíos que plantea el intentar desentrañar sus mecanismos en condiciones experimentales tan abarcativas.

## 7. Perspectivas.

Sería interesante repetir los experimentos con dosis de alúmina más bajas, representando un desafío menos exigente para el condicionamiento con wpLL. Asimismo, sería interesante evaluar la capacidad de wpLL de inhibir la respuesta innata frente a diferentes estímulos inflamatorios administrados localmente (LPS, zymosan), y la respuesta inmune adaptativa frente al antígeno modelo (OVA) en condiciones inductoras de un respuesta tipo 1.

Además, en relación al proyecto de desarrollo de asma alérgico en ratón, también resultaría interesante evaluar el uso de dosis menores de alúmina, que permitan evidenciar la capacidad de wpLL de establecer una inhibición de la respuesta inflamatoria en tejidos distales (pulmón) al tejido de inyección del material parasitario.

### 8. Bibliografía.

- Janeway, C. A. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1989**, *54 Pt 1*, 1–13. https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003.
- (2) Purnamasari, S.; Hidayat, R. The Role of Natural Physical, Mechanical, and Biochemical Barriers as Innate Immunity: A Narrative Literature Review. *Open Access Indones. J. Med. Rev.* **2023**, *3* (2), 361–364. https://doi.org/10.37275/oaijmr.v3i2.299.
- (3) Turvey, S. E.; Broide, D. H. Innate Immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125* (2), S24–S32. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016.
- (4) Bottazzi, B.; Doni, A.; Garlanda, C.; Mantovani, A. An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, 28 (Volume 28, 2010), 157–183. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101305.
- (5) McDonald, D. R.; Levy, O. Innate Immunity. In *Clinical Immunology*; Elsevier, 2019; pp 39-53.e1. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00003-X.
- (6) Viney, M. E.; Riley, E. M.; Buchanan, K. L. Optimal Immune Responses: Immunocompetence Revisited. *Trends Ecol. Evol.* 2005, 20 (12), 665–669. https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.003.
- (7) Murphy, Kenneth, W., Casey. *Janeway's Inmunobiology*., 9th edition.; Garland Science, Tylor & Francis Group: United States of America, 2017.
- (8) Vinuesa, C. G.; Linterman, M. A.; Yu, D.; MacLennan, I. C. M. Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2016**, *34* (1), 335–368.
  - https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055605.
- (9) Vignali, D. A. A.; Collison, L. W.; Workman, C. J. How Regulatory T Cells Work. *Nat. Rev. Immunol.* 2008, 8 (7), 523–532. https://doi.org/10.1038/nri2343.
- (10) Ross, S. H.; Cantrell, D. A. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, *36*, 411–433. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053352.
- (11)Walker, L. S. K. Treg and CTLA-4: Two Intertwining Pathways to Immune Tolerance. *J. Autoimmun.* **2013**, *45* (100), 49–57. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.06.006.
- (12) Bonilla, F. A.; Oettgen, H. C. Adaptive Immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125* (2), S33–S40. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017.
- (13) Medzhitov, R.; Janeway, C. Innate Immunity. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343* (5), 338–344. https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506.
- (14) Amendt, T.; Jumaa, H. Adaptive Tolerance: Protection through Self-Recognition. *BioEssays* **2022**, *44* (3), 2100236. https://doi.org/10.1002/bies.202100236.
- (15) Štefanova, I.; Dorfman, J. R.; Tsukamoto, M.; Germain, R. N. On the Role of Self-recognition in T Cell Responses to Foreign Antigen. *Immunol. Rev.* 2003, 191 (1), 97–106. https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00006.x.
- (16) Yin, X.; Chen, S.; Eisenbarth, S. C. Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2021**, *39*, 759–790.
  - https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101819-025146.
- (17) Hasegawa, H.; Matsumoto, T. Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 350. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00350.
- (18) Morelli, A. E.; Thomson, A. W. Tolerogenic Dendritic Cells and the Quest for Transplant Tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7* (8), 610–621. https://doi.org/10.1038/nri2132.
- Hotez, P. J.; Brindley, P. J.; Bethony, J. M.; King, C. H.; Pearce, E. J.; Jacobson, J. Helminth Infections: The Great Neglected Tropical Diseases. *J. Clin. Invest.* 2008, *118* (4), 1311–1321. https://doi.org/10.1172/JCI34261.
- (20) McSorley, H. J.; Maizels, R. M. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, *25* (4), 585. https://doi.org/10.1128/CMR.05040-11.
- (21) Gunn, A.; Pitt, S. J. Parasitology: An Integrated Approach; John Wiley & Sons, 2012.
- (22) Díaz, A.; Allen, J. E. Mapping Immune Response Profiles: The Emerging Scenario from Helminth Immunology. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37* (12), 3319–3326.

https://doi.org/10.1002/eji.200737765.

- (23) Kreider, T.; Anthony, R. M.; Urban, J. F.; Gause, W. C. Alternatively Activated Macrophages in Helminth Infections. *Curr. Opin. Immunol.* **2007**, *19* (4), 448–453. https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.002.
- (24) Dittrich, A. M.; Erbacher, A.; Specht, S.; Diesner, F.; Krokowski, M.; Avagyan, A.; Stock, P.; Ahrens, B.; Hoffmann, W. H.; Hoerauf, A.; Hamelmann, E. Helminth Infection with Litomosoides Sigmodontis Induces Regulatory T Cells and Inhibits Allergic Sensitization, Airway Inflammation, and Hyperreactivity in a Murine Asthma Model. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **2008**, *180* (3), 1792–1799. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1792.
- (25) Amu, S.; Saunders, S. P.; Kronenberg, M.; Mangan, N. E.; Atzberger, A.; Fallon, P. G. Regulatory B Cells Prevent and Reverse Allergic Airway Inflammation via FoxP3-Positive T Regulatory Cells in a Murine Model. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125* (5), 1114-1124.e8. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.018.
- (26) Wang, H.; Li, J.; Pu, H.; Hasan, B.; Ma, J.; Jones, M. K.; Zheng, K.; Zhang, X.; Ma, H.; McManus, D. P.; Lin, R.; Wen, H.; Zhang, W. Echinococcus Granulosus Infection Reduces Airway Inflammation of Mice Likely through Enhancing IL-10 and down-Regulation of IL-5 and IL-17A. *Parasit. Vectors* **2014**, *7* (1), 522. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0522-6.
- (27) Wait, L. F.; Dobson, A. P.; Graham, A. L. Do Parasite Infections Interfere with Immunisation? A Review and Meta-Analysis. *Vaccine* **2020**, *38* (35), 5582–5590. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.064.
- (28) Esen, M.; Mordmüller, B.; de Salazar, P. M.; Adegnika, A. A.; Agnandji, S. T.; Schaumburg, F.; Hounkpatin, A. B.; Brückner, S.; Theisen, M.; Bélard, S.; Ngoa, U. A.; Issifou, S.; Yazdanbakhsh, M.; Kremsner, P. G. Reduced Antibody Responses against *Plasmodium Falciparum* Vaccine Candidate Antigens in the Presence of *Trichuris Trichiura*. *Vaccine* **2012**, *30* (52), 7621–7624. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.026.
- (29) Patente, T. A.; Gasan, T. A.; Scheenstra, M.; Ozir-Fazalalikhan, A.; Obieglo, K.; Schetters, S.; Verwaerde, S.; Vergote, K.; Otto, F.; Wilbers, R. H. P.; van Bloois, E.; Wijck, Y. van; Taube, C.; Hammad, H.; Schots, A.; Everts, B.; Yazdanbakhsh, M.; Guigas, B.; Hokke, C. H.; Smits, H. H. S. Mansoni -Derived Omega-1 Prevents OVA-Specific Allergic Airway Inflammation via Hampering of cDC2 Migration. *PLoS Pathog.* **2024**, *20* (8), e1012457. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012457.
- (30) Nakao, M.; Lavikainen, A.; Yanagida, T.; Ito, A. Phylogenetic Systematics of the Genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.* **2013**, *43* (12–13), 1017–1029. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.002.
- (31) Cucher, M. A.; Macchiaroli, N.; Baldi, G.; Camicia, F.; Prada, L.; Maldonado, L.; Avila, H. G.; Fox, A.; Gutiérrez, A.; Negro, P.; López, R.; Jensen, O.; Rosenzvit, M.; Kamenetzky, L. 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* **2016**, *21* (2), 166–175. https://doi.org/10.1111/tmi.12647.
- (32) Budke, C. M.; Deplazes, P.; Torgerson, P. R. Global Socioeconomic Impact of Cystic Echinococcosis. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, *12* (2), 296. https://doi.org/10.3201/eid1202.050499.
- (33) Agudelo Higuita, N. I.; Brunetti, E.; McCloskey, C. Cystic Echinococcosis. J. Clin. Microbiol. **2016**, *54* (3), 518–523. https://doi.org/10.1128/jcm.02420-15.
- (34) Craig, P. S.; McManus, D. P.; Lightowlers, M. W.; Chabalgoity, J. A.; Garcia, H. H.; Gavidia, C. M.; Gilman, R. H.; Gonzalez, A. E.; Lorca, M.; Naquira, C.; Nieto, A.; Schantz, P. M. Prevention and Control of Cystic Echinococcosis. *Lancet Infect. Dis.* 2007, 7 (6), 385–394. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70134-2.
- (35) Equinococosis: Informe Epidemiológico en la región de América del Sur 2019-2021 -OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. https://www.paho.org/es/documentos/equinococosis-informe-epidemiologico-region-americ a-sur-2019-2021 (accessed 2024-07-24).
- (36) Equinococosis: Informe epidemiológico en la región de América del Sur 2018 -OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. https://www.paho.org/es/documentos/equinococosis-informe-epidemiologico-region-americ

a-sur-2018 (accessed 2024-07-24).

- (37) Thompson, R. C. A. Biology and Systematics of Echinococcus. In Advances in Parasitology; Elsevier, 2017; Vol. 95, pp 65–109. https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.001.
- (38) Moro, P.; Schantz, P. M. Echinococcosis: A Review. *Int. J. Infect. Dis.* **2009**, *13* (2), 125–133. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.03.037.
- (39) Coltorti, E. A.; Varela-Díaz, V. M. Echinococcus Granulosus: Penetration of Macromolecules and Their Localization on the Parasite Membranes of Cysts. *Exp. Parasitol.* **1974**, 35 (2), 225–231. https://doi.org/10.1016/0014-4894(74)90026-5.
- (40) Díaz, A.; Casaravilla, C.; Irigoín, F.; Lin, G.; Previato, J. O.; Ferreira, F. Understanding the Laminated Layer of Larval Echinococcus I: Structure. *Trends Parasitol.* 2011, 27 (5), 204–213. https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.012.
- (41) Díaz, A.; Casaravilla, C.; Allen, J. E.; Sim, R. B.; Ferreira, A. M. Understanding the Laminated Layer of Larval Echinococcus II: Immunology. *Trends Parasitol.* 2011, 27 (6), 264–273. https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.01.008.
- (42) Barrios, A. A. Estudios Sobre La Interacción in Vivo Entre Los Glicanos de La Capa Laminar de Echinococcus Granulosus y El Receptro Lectina CelC4F.
- (43) Heath, D. D. The Development of Echinococcus Granulosus Larvae in Laboratory Animals. *Parasitology* **1970**, *60* (3), 449–456. https://doi.org/10.1017/s0031182000078252.
- (44) Mourglia-Ettlin, G.; Marqués, J. M.; Chabalgoity, J. A.; Dematteis, S. Early Peritoneal Immune Response during Echinococcus Granulosus Establishment Displays a Biphasic Behavior. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5* (8), e1293. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001293.
- (45) Díaz, Á. Immunology of Cystic Echinococcosis (Hydatid Disease). *Br. Med. Bull.* **2017**. https://doi.org/10.1093/bmb/ldx033.
- (46) Riganò, R.; Buttari, B.; De Falco, E.; Profumo, E.; Ortona, E.; Margutti, P.; Scottà, C.; Teggi, A.; Siracusano, A. *Echinococcus Granulosus* - specific T - cell Lines Derived from Patients at Various Clinical Stages of Cystic Echinococcosis. *Parasite Immunol.* 2004, 26 (1), 45–52. https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00682.x.
- (47) Mondragón-De-La-Peña, C.; Ramos-Solís, S.; Barbosa-Cisneros, O.; Rodríguez-Padilla, C.; Tavizón-García, P.; Herrera-Esparza, R. *Echinococcus Granulosus* down Regulates the Hepatic Expression of Inflammatory Cytokines IL-6 and TNFα in BALB/c Mice. *Parasite* **2002**, *9* (4), 351–356. https://doi.org/10.1051/parasite/2002094351.
- (48) De Biase, D.; Prisco, F.; Pepe, P.; Bosco, A.; Piegari, G.; d'Aquino, I.; Russo, V.; Papparella, S.; Maurelli, M. P.; Rinaldi, L.; Paciello, O. Evaluation of the Local Immune Response to Hydatid Cysts in Sheep Liver. *Vet. Sci.* **2023**, *10* (5), 315. https://doi.org/10.3390/vetsci10050315.
- (49) Nutman, T. B. Looking beyond the Induction of Th2 Responses to Explain Immunomodulation by Helminths. *Parasite Immunol.* **2015**, 37 (6), 304–313. https://doi.org/10.1111/pim.12194.
- (50) Irigoín, F.; Casaravilla, C.; Iborra, F.; Sim, R. B.; Ferreira, F.; Díaz, A. Unique Precipitation and Exocytosis of a Calcium Salt of *Myo* -inositol Hexakisphosphate in Larval *Echinococcus Granulosu* s. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *93* (6), 1272–1281. https://doi.org/10.1002/jcb.20262.
- (51) Casaravilla, C.; Brearley, C.; Soulé, S.; Fontana, C.; Veiga, N.; Bessio, M. I.; Ferreira, F.; Kremer, C.; Díaz, A. Characterization of Myo-Inositol Hexakisphosphate Deposits from Larval Echinococcus Granulosus. *FEBS J.* **2006**, 273 (14), 3192–3203. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05328.x.
- (52) Casaravilla, C.; Díaz, A. Studies on the Structural Mucins of the Echinococcus Granulosus Laminated Layer. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2010**, *174* (2), 132–136. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.07.008.
- (53) Díaz, A.; Fontana, E. C.; Todeschini, A. R.; Soulé, S.; González, H.; Casaravilla, C.; Portela, M.; Mohana-Borges, R.; Mendonça-Previato, L.; Previato, J. O.; Ferreira, F. The Major Surface Carbohydrates of the Echinococcus Granulosus Cyst: Mucin-Type O-Glycans Decorated by Novel Galactose-Based Structures. *Biochemistry* **2009**, *48* (49),

11678–11691. https://doi.org/10.1021/bi901112q.

- (54) Lin, G.; Todeschini, A. R.; Koizumi, A.; Neves, J. L.; González, H.; Dematteis, S.; Hada, N.; Previato, J. O.; Ferreira, F.; Mendonça-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* **2013**, *23* (4), 438–452. https://doi.org/10.1093/glycob/cws220.
- (55) Casaravilla, C.; Pittini, Á.; Rückerl, D.; Seoane, P. I.; Jenkins, S. J.; MacDonald, A. S.; Ferreira, A. M.; Allen, J. E.; Díaz, Á. Unconventional Maturation of Dendritic Cells Induced by Particles from the Laminated Layer of Larval Echinococcus Granulosus. *Infect. Immun.* **2014**, *82* (8), 3164–3176. https://doi.org/10.1128/IAI.01959-14.
- (56) Casaravilla, C.; Pittini, Á.; Rückerl, D.; Allen, J. E.; Díaz, Á. Activation of the NLRP3 Inflammasome by Particles from the Echinococcus Granulosus Laminated Layer. *Infect. Immun.* **2020**, *88* (9), e00190-20. https://doi.org/10.1128/IAI.00190-20.
- (57) Seoane, P. I.; Rückerl, D.; Casaravilla, C.; Barrios, A. A.; Pittini, Á.; MacDonald, A. S.; Allen, J. E.; Díaz, A. Particles from the Echinococcus Granulosus Laminated Layer Inhibit IL-4 and Growth Factor-Driven Akt Phosphorylation and Proliferative Responses in Macrophages. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 39204. https://doi.org/10.1038/srep39204.
- (58) Pittini, Á.; Martínez-Acosta, Y. E.; Casaravilla, C.; Seoane, P. I.; Rückerl, D.; Quijano, C.; Allen, J. E.; Díaz, Á. Particles from the Echinococcus Granulosus Laminated Layer Inhibit CD40 Upregulation in Dendritic Cells by Interfering with Akt Activation. *Infect. Immun.* **2019**, 87 (12), e00641-19. https://doi.org/10.1128/IAI.00641-19.
- (59) Grezzi, L.; Martínez, Y. E.; Barrios, A. A.; Díaz, Á.; Casaravilla, C. Characterization of the Immunosuppressive Environment Induced by Larval Echinococcus Granulosus during Chronic Experimental Infection. *Infect. Immun.* **2024**, *92* (2), e00276-23. https://doi.org/10.1128/iai.00276-23.
- (60) Barrios, A. A.; Mouhape, C.; Schreiber, L.; Zhang, L.; Nell, J.; Suárez-Martins, M.; Schlapp, G.; Meikle, M. N.; Mulet, A. P.; Hsu, T.-L.; Hsieh, S.-L.; Mourglia-Ettlin, G.; González, C.; Crispo, M.; Barth, T. F. E.; Casaravilla, C.; Jenkins, S. J.; Díaz, Á. Mucins Shed from the Laminated Layer in Cystic Echinococcosis Are Captured by Kupffer Cells via the Lectin Receptor Clec4F. *Infect. Immun.* **2023**, *91* (6), e0003123. https://doi.org/10.1128/iai.00031-23.
- (61) 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, T. F. E. 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.* **2020**, *14* (12), e0008921. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008921.
- (62) Cucher, M.; Prada, L.; Mourglia-Ettlin, G.; Dematteis, S.; Camicia, F.; Asurmendi, S.; Rosenzvit, M. Identification of Echinococcus Granulosus microRNAs and Their Expression in Different Life Cycle Stages and Parasite Genotypes. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41* (3–4), 439–448. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.11.010.
- (63) Casaravilla, C. Capa Laminar de La Larva de Echinococcus Granulosus: Estructura e Interacciones Con Macrófagos y Células Dendriticas.
- (64) McKee, A. S.; Munks, M. W.; MacLeod, M. K. L.; Fleenor, C. J.; Rooijen, N. V.; Kappler, J. W.; Marrack, P. Alum Induces Innate Immune Responses through Macrophage and Mast Cell Sensors, but These Are Not Required for Alum to Act as an Adjuvant for Specific Immunity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **2009**, *183* (7), 4403. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900164.
- (65) Stephen, J.; Scales, H. E.; Benson, R. A.; Erben, D.; Garside, P.; Brewer, J. M. Neutrophil Swarming and Extracellular Trap Formation Play a Significant Role in Alum Adjuvant Activity. *NPJ Vaccines* **2017**, *2*, 1. https://doi.org/10.1038/s41541-016-0001-5.
- (66) Seubert, A.; Monaci, E.; Pizza, M.; O'Hagan, D. T.; Wack, A. The Adjuvants Aluminum Hydroxide and MF59 Induce Monocyte and Granulocyte Chemoattractants and Enhance Monocyte Differentiation toward Dendritic Cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 2008, 180 (8), 5402–5412. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5402.

- (67) Kool, M.; Soullié, T.; Van Nimwegen, M.; Willart, M. A. M.; Muskens, F.; Jung, S.; Hoogsteden, H. C.; Hammad, H.; Lambrecht, B. N. Alum Adjuvant Boosts Adaptive Immunity by Inducing Uric Acid and Activating Inflammatory Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **2008**, 205 (4), 869–882. https://doi.org/10.1084/jem.20071087.
- (68) Ghosn, E. E. B.; Cassado, A. A.; Govoni, G. R.; Fukuhara, T.; Yang, Y.; Monack, D. M.; Bortoluci, K. R.; Almeida, S. R.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A. Two Physically, Functionally, and Developmentally Distinct Peritoneal Macrophage Subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (6), 2568–2573. https://doi.org/10.1073/pnas.0915000107.
- (69) Cassado, A. dos A.; Albuquerque, J. A. T. de; Sardinha, L. R.; Buzzo, C. de L.; Faustino, L.; Nascimento, R.; Ghosn, E. E. B.; Lima, M. R. D.; Alvarez, J. M. M.; Bortoluci, K. R. Cellular Renewal and Improvement of Local Cell Effector Activity in Peritoneal Cavity in Response to Infectious Stimuli. *PLOS ONE* **2011**, *6* (7), e22141. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022141.
- (70) Cassado, A. dos A.; D'Império Lima, M. R.; Bortoluci, K. R. Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. *Front. Immunol.* **2015**, 6. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00225.
- (71) Terrazas, C.; de Dios Ruiz-Rosado, J.; Amici, S. A.; Jablonski, K. A.; Martinez-Saucedo, D.; Webb, L. M.; Cortado, H.; Robledo-Avila, F.; Oghumu, S.; Satoskar, A. R.; Rodriguez-Sosa, M.; Terrazas, L. I.; Guerau-de-Arellano, M.; Partida-Sánchez, S. Helminth-Induced Ly6Chi Monocyte-Derived Alternatively Activated Macrophages Suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Sci. Rep.* 2017, *7*, 40814. https://doi.org/10.1038/srep40814.
- (72) Gorman, S.; Weeden, C. E.; Tan, D. H. W.; Scott, N. M.; Hart, J.; Foong, R. E.; Mok, D.; Stephens, N.; Zosky, G.; Hart, P. H. Reversible Control by Vitamin D of Granulocytes and Bacteria in the Lungs of Mice: An Ovalbumin-Induced Model of Allergic Airway Disease. *PloS One* **2013**, *8* (6), e67823. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067823.