Tesis de Doctorado

Impacto de CD40L sobre las respuestas de los macrófagos a la IL-4, con énfasis en el CD40L disponible en condiciones basales

PEDECIBA Biología, subárea Biología celular y molecular

MSc. Mariana Suárez

Tutor: Álvaro Díaz

Co-tutora: Cecilia Casaravilla

Unidad Académica de Inmunología

Facultad de Química/Ciencias

Universidad de la República

2025

Agradecimientos

En primer lugar, gracias a mis tutores, Álvaro y Ceci, por haberme dado la oportunidad de realizar el doctorado con ustedes, aun cuando tenía otros dos trabajos y ninguna experiencia en inmunología. Aunque al principio debo admitir que tenía mucho miedo de no poder trabajar con animales, Ceci fue un apoyo fundamental para que me animara a hacerlo con el mayor respeto y cariño posible. Gracias Ceci, también por acompañarme en mis primeros pasos en la mesada y por aportar ideas valiosas para que este trabajo pudiera concretarse. Álvaro, este trabajo salió adelante en gran parte gracias a vos. Gracias por ser un excelente tutor, por escucharme, por estar pendiente de cada paso y por mantenerte positivo incluso cuando las cosas no salían como esperábamos. En estos 5 años he aprendido muchísimo de vos y ojalá que así siga siendo. Gracias por darme la oportunidad de seguir aprendiendo.

También agradezco especialmente a Judi y Conor, quienes participaron desde el inicio en este proyecto a la distancia, haciendo aportes clave y ayudándonos a ir desenredando los resultados. Judi, mil gracias por recibirme dos veces en tu laboratorio; fueron experiencias increíbles, no solo desde lo profesional, sino también desde lo personal. A todo el Allen lab: Pedro, Brian, Lili, James, Georgia, Becky, Hannah y Stella, gracias por hacerme sentir parte de ustedes desde el primer momento, por tener paciencia con mi inglés y por estar siempre dispuestos a darme una mano cuando los experimentos se volvían gigantes.

Gracias a Steve, por venir a Uruguay y compartir dos semanas intensas en las que nos enseñaste muchísimo. Gracias por involucrarte en nuestro proyecto y dedicar tantas horas a discutir los resultados. Tu visita fue fundamental para poder darle cierre a este trabajo.

Gracias a las agencias financiadoras, que fueron un soporte indispensable para que pudiera realizar esta tesis: ANII y CAP, por las becas de doctorado; CSIC I+D e ICGEB, por la financiación de proyectos en los cuales se enmarcó mi posgrado; y ANII, PEDECIBA, The Company of Biologists y la Wolfson Bob Sim Uruguay Initiative, por financiar las dos pasantías que realicé en la Universidad de Manchester.

Gracias Edith Sim por recibirme en Oxford durante mi visita al Wolfson College y por ser tan cálida, permitiéndome mostrar mi trabajo a varios investigadores y llevarme a conocer lugares hermosos. Fue una estadía realmente inolvidable.

Muchas gracias a todos los integrantes del Área Inmunología. Es un placer venir a trabajar cada día en un ambiente tan lindo.

Casita del medio, los amo. Son todos grandes científicos, algunos ya consolidados y otros en formación, gracias por escucharme decenas de veces hablar sobre

CD40L y por aconsejarme para seguir adelante. Pero, sobre todo, agradezco las excelentes personas que son, siempre están en los momentos buenos, pero también en los muy malos.

Gracias infinititas a mis amigas, las de toda la vida y las que me dejó este camino hermoso por Facultad de Ciencias. Gracias Cobritas, por estar siempre y apoyarme en todo.

Por último, pero los más importantes, agradezco a mi familia. Gracias por apoyarme y siempre alentarme para que siga adelante, nada de esto hubiera sido posible sin ustedes. Gracias Má, Ro y en especial Papi, te lo prometí, y llegué.

A todas las personas que caminaron conmigo en este proceso, gracias. Esta tesis lleva un pedacito de cada uno de ustedes.

Índice

Índice 4

Resumen 9

Lista de Abreviaturas 11

Índice de figuras 15

1 Introducción 20

1.1 Respuestas inmunitarias de tipo 2 20

1.1.1 Generalidades de las respuestas de tipo 2 20

1.1.2 *Heligmosomoides polygyrus*, un modelo biológico para el estudio de la respuesta de tipo 2 22

1.2 Macrófagos 25

1.2.1 Generalidades sobre los macrófagos 25

1.2.2 Polarización de macrófagos 26

1.3 Aspectos generales de la cavidad peritoneal 28

1.3.1 Macrófagos de la cavidad peritoneal 30

1.4 El hígado y las células de Kupffer 35

1.5 CD40 y CD40L 37

1.5.1 Regulación y presentaciones de CD40L 39

1.6 CD40-CD40L en respuestas inmunes de tipo 2 41

1.6.1 Papel de CD40-CD40L sobre los macrófagos en respuestas de tipo 2 42

1.7 Hipótesis de trabajo 43

2 Objetivos 45

2.1 Objetivo general 45

2.2 Objetivos específicos 45

3 Materiales y métodos 46

3.1 Animales de experimentación 46

3.2 Procesamiento de las muestras biológicas colectadas 47

3.2.1 Obtención de células de la CP 47

3.2.1.1 Purificación de macrófagos de la CP 48

3.2.2 Obtención de células del bazo 49

3.2.2.1 Purificación de células T CD4⁺ del bazo 49
3.2.3 Obtención de células de los ganglios mesentéricos 50
3.2.4 Procesamiento del hígado para la obtención de la fracción no parenquimal hepática 50
3.3 Experimentos *in vitro* 51
3.3.1 Cultivo y estimulación de células totales de la CP en condiciones basales 51
3.3.2 Cultivo y estimulación de células totales de la CP en condiciones inflamatorias 52
3.3.3 Cultivos de células de la CP sin células T CD4⁺ 53
3.3.4 Cultivos de macrófagos y células T CD4⁺ de la CP purificados por *cell sorting* 53
3.3.5 Cultivos de células de la CP estimulados con el fluido de la CP de ratones vírgenes o inyectados con IL-4c 54
3.3.6 Cultivos de células de la CP en condiciones de hipoxia 55
3.3.7 Co-cultivos de células de la CP o macrófagos purificados con células de bazo 56
3.4 Experimentos *in vivo*. 56
3.4.1 Experimentos de bloqueo de CD40L 56
3.4.1.1 Bloqueo de CD40L y estudio de las respuestas de los macrófagos peritoneales basales a la IL-4 56
3.4.1.2 Bloqueo de CD40L y estudio de las respuestas de los macrófagos inflamatorios a la IL-4 58
3.4.1.3 Bloqueo de CD40L y estudio de las poblaciones celulares presentes en la CP 59
3.4.2 Experimentos de comparación de macrófagos WT *vs* CD40 KO 60
3.4.2.1 Estudio comparativo de las respuestas a IL-4 en macrófagos peritoneales WT y CD40 KO 60
3.4.2.2 Estudio comparativo de las poblaciones presentes en la CP de ratones WT y CD40 KO 60
3.4.3 Experimentos con el anticuerpo agonista de CD40 60
3.4.3.1 Determinación de la dosis óptima del anticuerpo agonista de CD40 60
3.4.3.2 Estudio de las respuestas de los macrófagos a la IL-4 en presencia del anticuerpo agonista de CD40 61

3.4.4 Experimentos de transferencia de macrófagos 62

3.4.4.1 Marcado de macrófagos peritoneales *in vivo* con PKH26-PCL ... 62

3.4.4.2 Estudio de la proliferación y polarización M(IL-4) de los macrófagos de la CP marcados con PKH26-PCL 63

3.4.4.3 Transferencia de macrófagos WT o CD40 KO PKH26-PCL$^+$ a la CP de ratones WT..... 63

3.4.5 Experimentos de transferencia de macrófagos y células T CD4$^+$.... 64

3.4.6 Experimentos de infección con *H. polygyrus*..... 65

3.5 Técnicas de análisis 67

3.5.1 Citometría de flujo..... 67

3.5.1.1 Medida de CD40L total y de superficie en las células T CD4$^+$ de la CP.....72

3.5.1.2 Medida de CD40 en la superficie de los macrófagos y células B de la CP.....73

3.5.1.3 Estudio de la composición de la CP por citometría de flujo 74

3.5.2 Cuantificación de mediadores solubles por ELISA 76

3.6 Análisis estadístico. 77

4 Resultados..... 78

4.1 Resultados 1: CD40L endógeno en contexto basal: experimentos *in vitro* 79

4.1.1 Descriptiva de la expresión de CD40 y CD40L en las células de la CP.....79

4.1.2 La ausencia del CD40L endógeno no modifica la polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales en cultivo..... 81

4.1.3 El CD40L endógeno en alta disponibilidad no modifica la polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales en cultivo 86

4.1.4 La presencia de LPS contaminante en el anticuerpo bloqueante de CD40L inhibe fuertemente las respuestas a la IL-4 de los macrófagos en cultivo.....88

4.2 Resultados 2: CD40L endógeno en contexto basal: experimentos *in vivo*.....91

4.2.1 Descriptiva del CD40L endógeno en las células de la CP..... 91

4.2.2 El CD40L endógeno interactúa con el CD40 de los macrófagos de la CP en ausencia de interacciones específicas 94

4.2.3 El bloqueo de CD40L *in vivo* no tiene efectos sobre las respuestas de los macrófagos de la CP a la IL-4 exógena en condiciones basales 99

4.2.4 El bloqueo de CD40L *in vivo* no tiene efectos sobre las respuestas de las células de Kupffer a la IL-4 exógena 103

4.2.5 La expresión de RELM-α e Ym1 inducida por la IL-4 exógena está potenciada en los macrófagos de ratones CD40 KO, mientras que los niveles de proliferación son normales 105

4.2.6 El efecto de la ausencia de CD40 sobre la expresión de RELM-α en los LPM no es autónomo de célula 109

4.3 Resultados 3: CD40L endógeno en contexto inflamatorio 119

4.3.1 Descriptiva del CD40L en un contexto inflamatorio 119

4.3.2 El bloqueo de CD40L *in vivo* no tiene efectos sobre las respuestas de los macrófagos de la CP a la IL-4 exógena en condiciones inflamatorias ... 121

4.4 Resultados 4: Papel de CD40-CD40L en las poblaciones de la CP .. 124

4.4.1 En la CP de ratones CD40 KO hay menos células T $CD4^+$, particularmente vírgenes, que en la CP de los ratones los WT..... 124

4.4.2 El bloqueo de CD40L causa una disminución en los números de células T $CD4^+$ en la CP, así como también de otros tipos celulares 127

4.4.3 La falta de células T en la CP de los ratones CD40 KO no incluye una deficiencia en células T reguladoras 129

4.5 Resultados 5: Agonistas exógenos de CD40 132

4.5.1 El sCD40L inhibe la polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales en cultivo 132

4.5.2 El anticuerpo agonista de CD40 inhibe fuertemente las respuestas de los macrófagos peritoneales a la IL-4 exógena *in vivo* 134

4.6 Resultados 6: CD40L en el contexto de la infección por *H. polygyrus* 144

4.6.1 Descriptiva de la CP durante la infección por *H. polygyrus*..... 144

4.6.2 Durante la infección por *H. polygyrus*, aumenta la expresión de CD40L en las células T $CD4^+$ de la CP 150

4.6.3 El bloqueo de CD40L durante la infección por *H. polygyrus* potencia las respuestas de los macrófagos de la CP..... 151

4.6.4 El bloqueo de CD40L durante la infección por *H. polygyrus* no afecta la proliferación de las células de Kupffer 156

4.7 Resultados 7: Búsqueda del estímulo faltante para la proliferación *in vitro* de los macrófagos de cavidad peritoneal en respuesta a IL-4 162

4.7.1 El fluido obtenido de la CP no habilita la proliferación de macrófagos peritoneales *in vitro* en respuesta a la IL-4 162

4.7.2 En condiciones de hipoxia, la IL-4 no promueve la proliferación de los macrófagos de la CP en cultivo 165

5 Discusión 169

5.1 Impacto del CD40L sobre las respuestas de los macrófagos a la IL-4 169

5.1.1 CD40L endógeno en condiciones basales 169

5.1.2 Agonistas exógenos solubles de CD40 172

5.1.3 CD40L en el contexto de infección por *H. polygyrus* 174

5.1.4 Integración: Efecto de los distintos agonistas de CD40 sobre las respuestas de los macrófagos en un contexto de tipo 2 182

5.2 El CD40L constitutivo y su posible vínculo con el mantenimiento de los números homeostáticos de células inmunes en la CP 185

5.3 Búsqueda de señales coestimuladoras necesarias para la proliferación *in vitro* de macrófagos inducida por IL-4. 190

6 Conclusiones 193

7 Perspectivas 194

8 Bibliografía 196

Resumen

La acumulación de macrófagos durante procesos inflamatorios es originada tanto por el reclutamiento de monocitos precursores como por la proliferación local de macrófagos. Este segundo mecanismo fue descrito inicialmente en contextos inmunológicos de tipo 2, los cuales son predominantemente generados por las citoquinas IL-4 e IL-13. Además de promover la proliferación, estas citoquinas inducen la polarización de los macrófagos hacia fenotipos denominados M(IL-4), funcionalmente opuestos a los asociados a su activación clásica.

La interacción entre CD40 y su ligando CD40L es clave en diversas funciones del sistema inmune. CD40L, expresado principalmente en células T $CD4^+$ activadas, es importante en la interacción específica con células presentadoras de antígeno, que expresan CD40. Sin embargo, CD40 también puede o podría ser activado fuera de este contexto, tanto por agonistas solubles, como, potencialmente, por el CD40L que es constitutivamente expresado, en bajos niveles, por las células T $CD4^+$ vírgenes. Tanto el CD40L inducido por antígeno como el constitutivo son regulados negativamente por internalización desencadenada por la interacción con CD40.

El papel de la interacción CD40–CD40L en la rama Th2 de la inmunología aún no se comprende completamente. En cuanto a su impacto sobre los macrófagos, la evidencia disponible se limita a un único reporte, que indica un posible efecto inhibitorio de agonistas exógenos de CD40 sobre la expresión de marcadores M(IL-4). Sin embargo, distintos formatos de CD40L y de otros agonistas de CD40 pueden tener efectos diferentes sobre las células que expresan CD40. Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis fue estudiar el impacto de diferentes agonistas de CD40 sobre la proliferación y polarización de los macrófagos en contextos tipo 2, con énfasis en el estudio del CD40L endógeno presente en estado estacionario, que incluye predominantemente al CD40L constitutivo de células T $CD4^+$ vírgenes. El trabajo se enfocó principalmente en células de la cavidad peritoneal y, secundariamente, en células de Kupffer, que son los macrófagos residentes fijos hepáticos.

Mediante diversas metodologías, como el uso de ratones WT y CD40 KO, el bloqueo de CD40L y cultivos de células peritoneales sin células T, entre otras, se determinó que el CD40L endógeno basal no impacta la polarización de los macrófagos estimulados con IL-4 en cultivo.

Se verificó que, en la cavidad peritoneal, las células T $CD4^+$ vírgenes son las únicas que muestran una expresión en superficie significativa de CD40L. Además, mediante experimentos de transferencia adoptiva de células, se determinó que el CD40L constitutivo de las células T $CD4^+$ vírgenes puede interactuar con CD40 expresado por macrófagos en la cavidad peritoneal *in vivo*.

Se analizó cómo el CD40L endógeno basal afecta la respuesta a IL-4 de macrófagos peritoneales *in vivo*, mediante bloqueo de CD40L, comparación entre ratones WT y CD40 KO, y transferencia adoptiva de macrófagos de los dos genotipos. También se evaluó si las células de Kupffer, en contacto potencial con células T $CD4^+$ circulantes que expresan CD40L constitutivo, son sensibles a este ligando en términos de su respuesta a IL-4 exógena. De forma consistente con los resultados *in vitro*, se determinó que el CD40L basal no impacta en las respuestas a IL-4 de los tipos de macrófagos mencionados, exceptuando algunos efectos débiles y no directos sobre los macrófagos. No obstante, tanto en ausencia de CD40 como en condiciones de bloqueo de CD40L, se observó una disminución en el número de células T, $CD4^+$ y $CD8^+$, presentes basalmente en la cavidad peritoneal, en particular en las de fenotipo virgen. Finalmente, en un modelo de peritonitis aguda estéril, el CD40L tampoco alteró la respuesta a IL-4 de macrófagos inflamatorios.

Por otro lado, en coincidencia con lo previamente reportado en un modelo tumoral, se observó que los agonistas exógenos, solubles, de CD40 inhiben fuertemente tanto la polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales, *in vitro* e *in vivo*, como su proliferación *in vivo* en respuesta a la IL-4 exógena.

Además, se utilizó el modelo de infección murina por el nemátodo intestinal *Heligmosomoides polygyrus*, en el cual se verificó aumento en la expresión de CD40L en la superficie de las células T $CD4^+$ de la cavidad peritoneal, lo que sugiere la presentación de antígeno en este sitio. A partir de esta base, se observó que el bloqueo de CD40L potencia la proliferación y polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales. Esto sugiere que los efectos del CD40L inducido en un contexto específico de antígeno se asemejan a los de los agonistas de CD40 exógenos, ya que ambos antagonizan los efectos de la IL-4. En contraste con la cavidad peritoneal, en el hígado, donde no se observó aumento en la expresión de CD40L en las células T $CD4^+$, el bloqueo de CD40L no tuvo efecto sobre la proliferación de las células de Kupffer.

En suma, los resultados de esta tesis muestran que tanto los agonistas exógenos solubles de CD40 como el CD40L inducido por antígeno atenúan la respuesta de los macrófagos peritoneales a la IL-4, mientras que el CD40L constitutivo expresado por células T $CD4^+$ vírgenes no modifica dicha respuesta, pese a interaccionar con CD40 expresado en macrófagos. Además, resultados inesperados sugieren que el CD40L constitutivo podría desempeñar un papel en el mantenimiento de los números homeostáticos de células T vírgenes presentes en la cavidad peritoneal.

Lista de Abreviaturas

11B11	anticuerpo monoclonal anti IL-4
1C10	anticuerpo monoclonal agonista de CD40
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa I	desoxirribonucleasa I
AF	alexa fluor
ANOVA	análisis de la varianza
AOPI	naranja de acridina (AO) y el yoduro de propidio (PI)
APC	aloficocianina
APC-Cy7	conjugado en tándem de APC y cianina 7
Arg-1	arginasa 1
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BrdU	bromodesoxiuridina
Breg	células B reguladoras
BSA	serolabúmina bovina
BV	violeta brillante
CB	células B
CCM	macrófagos de cavidad en conversión
CD102	*cluster* de diferenciación 102, también llamado molécula de adhesión intercelular 2, ICAM-2
CD11b	*cluster* de diferenciación 11b, usado como marcador de células mieloides
CD16	*cluster* de diferenciación 16, receptor FcγRIII
CD19	*cluster* de diferenciación 32, marcador de células B
CD25	*cluster* de diferenciación 25, cadena α del receptor de IL-2
CD3	*cluster* de diferenciación 3, marcador de células T
CD31	*cluster* de diferenciación 31, marcador de células endoteliales
CD32	*cluster* de diferenciación 32, receptor FcγRII
CD4	*cluster* de diferenciación 4, marcador de células T $CD4^+$
CD40	*cluster* de diferenciación 40, molécula co-estimuladora
CD40L	ligando de CD40
CD44	*cluster* de difereciación 44, marcador de activación, memoria o diferenciación celular
CD45	*cluster* de diferenciación 45, marcador de células hematopoyéticas
CD62L	*cluster* de diferenciación 62L, también conocido como L-selectina
CD73	cluster de diferenciación 73, marcador de distintos tipos celulares asociado a un fenotipo regulador
CD8	*cluster* de diferenciación 8, marcador de células T $CD8^+$
CD80	*cluster* de diferenciación 80, molécula co-estimuladora, también conocido como B7.1
CD86	*cluster* de diferenciación 86, molécula co-estimuladora también conocido como B7.2
CHEA	Comisión Honoraria de Experimentación Animal
c-kit	marcador de mastocitos

CO_2	dióxido de carbono
CP	cavidad peritoneal
CpG	secuencias de ADN con una citosina seguida por una guanina, unidas por un fosfato
CPM	macrófagos peritoneales en conversión
CSF-1	factor estimulante de colonias de macrófagos, también conocido como M-CSF
CSF1R	receptor de CSF-1 o M-CSF
CTLA-4	antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos, molécula inhibidora clave en la regulación de la respuesta inmune
DC	células dendríticas
EDTA	ácido etilendiaminotetra-acético
EdU	5-etinil-2´-desoxiuridina
ELISA	enzimoinmunoensayo
Eo	eosinófilos
EU	unidades de enzima
F4/80	molécula que se usa como marcador de macrófagos en ratón
FACS	*Fluorescent Activated Cell Sorting*
FALC	acúmulos linfoides asociados a tejido adiposo
Fc	región constante de inmunoglobulinas
FC	citometría de flujo
FCP	fluido de cavidad peritoneal
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FMO	fluorescencia menos uno
FOXP3	marcador de células T reguladoras
FRβ	receptor de folato beta, marcador de CCM
FSC	dispersión frontal
GATA3	factor de transcripción fundamental para la diferenciación Th2
GATA6	factor de transcripción fundamental para la diferenciación de LPM
Geo-MFI	media geométrica de intensidad de fluorescencia
GL117	anticuerpo monoclonal anti beta-galactosidasa de rata, usado como control isotípico IgG2a
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
Gr1	marcador de monocitos y neutrófilos
H-2	locus de MHCII
H_2O_2	peróxido de hidrógeno
H_2SO_4	ácido sulfúrico
HEV	vénulas del alto endotelio
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular 1
ICOS	coestimulador inducible de células T
IFN-γ	interferón gamma
IgG/IgM/IgE/IgA	inmunoglobulina G, M, E o A
IH	Instituto de Higiene

IL	interleuquina
IL-4c	complejo IL-4 : anticuerpo monoclonal anti IL-4 (relación 1:5 en masa)
IL-4R	receptor de la IL-4
ILC	células linfoides innatas
IMacs	macrófagos inflamatorios
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
JAK/STAT	vía de señalización *Janus Kinasas-Signal Transducer and Activator of Transcription*
KC	células de Kupffer
Ki-67	proteína nuclear, marcador de proliferación
KO	*knockout*
KU	*Kunitz unit*
L3	larvas en estadío 3
LCM	Macrófagos de cavidades grandes
LPM	macrófagos peritoneales grandes
LPS	lipopolisacárido
LSEC	célula del endotelio sinusoidal hepático
Ly-6C	marcador de monocitos
Ly-6G	marcador de neutrófilos
M1	macrófago(s) clásicamente activado(s)
M2	macrófago(s) activado(s) alternativamente
Macs	macrófagos
MAPK	proteína quinasas activadas por mitógenos
MC	memoria central
M-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos, también conocido como CSF-1
MDR	reacción de desaparición de macrófagos
ME	memoria efectora
$MgCl_2$	cloruro de magnesio
MHC-I/II	molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I/II
Mo	monocitos
MR1	anticuerpo bloqueante de CD40L
N	neutrófilos
NF-kβ	factor nuclear kappa beta
NH_4Cl	cloruro de amonio
NK	(células) asesinas naturales
NKT	(células) T asesinas naturales
NO	óxido nítrico
O_2	oxígeno
OVA	ovoalbúmina
p.o.	por boca
PBS	buffer fosfato salino
PE	ficoeritrina
PEC	células del exudado peritoneal

PE-CF594	conjugado en tándem de PE y CF594
PE-Cy7	conjugado en tándem de PE y cianina 7
PerCP-Cy5	conjugado en tándem de proteínas peridinina clorofila y cianina 5
PFA	paraformaldehído
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PKH26-PCL	colorante para células fagocíticas
PLCγ	fosfolipasa C gamma
PMA/ionomicina	fórbol 12-miristato 13-acetato/ionomicina
RELM-α	molécula alfa similar a resistina, también conocida como FIZZ1
RELM-β	molécula beta similar a resistina, también conocida como FIZZ2
RPMI	medio *Roswell Park Memorial Institute*
s.c.	subcutánea
sCD40L	CD40L soluble
SCID	inmunodeficiencia combinada grave
SCM	macrófagos de cavidades pequeños
SFB	suero fetal bovino
Siglec-F	marcador de eosinófilos
SPM	macrófagos peritoneales pequeños
SSC	dispersión lateral
TAMs	macrófagos asociados a tumores
TCR	receptor de linfocito T
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta
Th1/Th2	células T colaboradoras de tipo 1, 2
TLR	receptor tipo Toll
TMB	tetrametilbencidina
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
Tregs	células T reguladoras
TSLP	linfopoyetina del estroma tímico
UK	Reino Unido
UMAP	técnica de reducción de dimensiones, *Uniform Manifold Approximation and Projection*
URBE	Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación
V	virgen/vírgenes
WT	tipo silvestre
Ym1	proteína similar a quitinasa 1, también llamada Chil3

Índice de figuras

Figura 1.1. Ciclo de vida de *Heligmosomides polygyrus* en ratones.... 23

Figura 1.2. Representación del omento y FALC en ratones..... 29

Figura 1.3. Modelo del origen y reemplazo de los LPM en condiciones de homeostasis e inflamación 34

Figura 1.4. Esquema de la estructura del hígado 36

Figura 1.5. Representación de la interacción CD40-CD40L 38

Figura 3.1. Purificación de macrófagos a partir de células de la CP en condiciones basales..... 48

Figura 3.2. Purificación de células T $CD4^+$ a partir del bazo de un ratón CD40 KO..... 50

Figura 3.3. Estrategia de definición celular utilizada para la detección macrófagos y células B en los experimentos de CP *in vitro* 52

Figura 3.4. Estrategia de definición celular utilizada para la detección de macrófagos y células B en los experimentos de CP *in vivo* 57

Figura 3.5. Estrategia de definición celular utilizada para el estudio de las células de Kupffer 58

Figura 3.6. Estrategia de definición celular utilizada para el estudio de los IMacs de la CP..... 59

Figura 3.7. Estrategia de definición celular utilizada para el estudio de los macrófagos $Tim4^+$ y $Tim4^-$ de la CP..... 61

Figura 3.8. Análisis de incorporación de PKH26-PCL en los macrófagos de la CP..... 632

Figura 3.9. Estrategia de definición celular utilizada para el estudio de las células de la CP en contexto de la infección por *H. polygyrus*, con énfasis en las trayectorias de macrófagos 66

Figura 3.10. Estrategia de definición celular para la detección de CD40L en Las células T $CD4^+$ de la CP 73

Figura 3.11. Estrategia de definición celular para la detección de CD40 en macrófagos y células B de la CP 74

Figura 3.12. Estrategia de definición celular extendida utilizada para el estudio de las células de la CP en contexto basal 75

Figura 3.13. Estrategia de definición celular extendida utilizada para el estudio de las células de la CP en contexto inflamatorio 75

Figura 4.1.1. Los LPM de la CP expresan más CD40 en su superficie que los SPM y las células B. 79

Figura 4.1.2. El cultivo de células T CD4$^+$ de la CP tiende a reducir la expresión superficial de CD40L, especialmente en presencia de IL-4 80

Figura 4.1.3. La presencia del CD40L endógeno no afecta la polarización M(IL-4) de macrófagos peritoneales en cultivo 821

Figura 4.1.4. La ausencia de células T CD4$^+$ no modifica la polarización M(IL-4) de macrófagos presentes en cultivos de células de CP 843

Figura 4.1.5. En la CP de ratones SCID no se detecta CD40L de superficie celular 85

Figura 4.1.6. Los macrófagos peritoneales de ratones SCID se polarizan normalmente en respuesta a IL-4 en cultivo 865

Figura 4.1.7. El CD40L endógeno disponible en alto nivel tampoco afecta la polarización M(IL-4) *in vitro* de los macrófagos peritoneales 887

Figura 4.1.8. El LPS contaminante en el anticuerpo anti CD40L inhibe fuertemente las respuestas a la IL-4 de macrófagos peritoneales en cultivo 89

Figura 4.2.1. Las células T CD4$^+$ de la CP expresan CD40L 921

Figura 4.2.2. Las células T CD4$^+$ V son las que más externalizan CD40L 93

Figura 4.2.3 Diagrama de los experimentos de doble transferencia de células 94

Figura 4.2.4. Las células T CD4$^+$ purificadas del bazo de animales CD40 KO son mayoritariamente vírgenes y expresan CD40L de superficie 95

Figura 4.2.5. Luego de la transferencia de células T CD4$^+$ purificadas se detectan más células T CD4$^+$ V en la CP de los ratones receptores 96

Figura 4.2.6. En la CP de los ratones CD40 KO transferidos con macrófagos WT se detectan una pequeña fracción de macrófagos CD40$^+$ 97

Figura 4.2.7. El CD40 de los macrófagos peritoneales regula la expresión de CD40L de superficie en las células T CD4$^+$ *in vivo* 98

Figura 4.2.8. El bloqueo del CD40L endógeno no afecta la polarización M(IL-4) de los macrófagos de CP 100

Figura 4.2.9. El bloqueo del CD40L endógeno no afecta la proliferación de los macrófagos de CP en respuesta a IL-4 1021

Figura 4.2.10. El bloqueo del CD40L endógeno no afecta la expresión basal de MHCII en los macrófagos de CP 1032

Figura 4.2.11. El bloqueo del CD40L no modifica la proliferación de las células de Kupffer en respuesta a IL-4 104

Figura 4.2.12. Los LPM de animales CD40 KO expresan niveles más altos de RELM-α y Ym1 en respuesta a la IL-4 que los de los animales WT 106

Figura 4.2.13. Los macrófagos de animales CD40 KO proliferan normalmente en respuesta a la IL-4..... 1098

Figura 4.2.14. La ausencia de CD40 no modifica la expresión basal de MHCII en los macrófagos de CP..... 109

Figura 4.2.15. La sonda PKH26-PCL no interfiere con la proliferación de macrófagos de CP
.....1132

Figura 4.2.16. La sonda PKH26-PCL no modifica la polarización M(IL-4) de macrófagos de CP 1143

Figura 4.2.17. Diagrama de los experimentos de transferencia de macrófagos..... 114

Figura 4.2.18. La eficiencia de la transferencia de macrófagos de la CP está entre 20 y 40 %, para LPM y SPM, independientemente del genotipo..... 115

Figura 4.2.19. La ausencia de CD40 en los LPM no impacta en forma autónoma de célula sobre su expresión de RELM-α inducida por la IL-4 1176

Figura 4.2.20. Los efectos negativos de la transferencia de células sobre la proliferación de macrófagos en respuesta a IL-4 impiden obtener un resultado sobre el impacto de la presencia de CD40 en los macrófagos 1187

Figura 4.3.1. Los macrófagos y las células B en contexto inflamatorio expresan niveles de CD40 más bajos que los observados en contexto basal 12019

Figura 4.3.2. Las células T $CD4^+$ en contexto inflamatorio expresan niveles de CD40L endógeno similares a los observados en contexto basal..... 12120

Figura 4.3.3. El bloqueo del CD40L en contexto inflamatorio no afecta la proliferación ni la inducción de Arginasa en los macrófagos peritoneales en respuesta a IL-4..... 122

Figura 4.4.1. En la CP de ratones CD40 KO hay menos células T $CD4^+$ y $CD8^+$ que en los ratones WT..... 1254

Figura 4.4.2. En la CP de ratones CD40 KO son particularmente escasas las células T vírgenes..... 125

Figura 4.4.3. En los ganglios mesentéricos y el bazo de ratones CD40 KO se observan cantidades de células T $CD4^+$ similares a las presentes en los ratones WT..... 126

Figura 4.4.4. El bloqueo de CD40L parece generar una reducción en los números de células circulantes presentes en la CP..... 128

Figura 4.4.5. La reducción en la cantidad de células T $CD4^+$ y T $CD8^+$ en la CP que generaría el bloqueo de CD40L abarcaría a las células vírgenes, CM y EM 128

Figura 4.4.6. En la CP de ratones CD40 KO se observan menos células T $CD4^+$ reguladoras que en los ratones WT, pero en mayor frecuencia en relación al conjunto de las células $CD4^+$..... 130

Figura 4.5.1. El sCD40L inhibe la polarización M(IL-4) de los macrófagos de CP en cultivo 1332

Figura 4.5.2. La estimulación con IL-4 + sCD40L induce la proliferación de células B, pero no de macrófagos, en cultivos de células totales de la CP en condiciones basales..... 134

Figura 4.5.3. La inyección del anticuerpo agonista de CD40 reduce la recuperación de las células de la CP de manera dependiente de la dosis..... 135

Figura 4.5.4. La administración del anticuerpo agonista de CD40 tiende a potenciar la expresión de marcadores de activación en los macrófagos y células B de la CP..... 136

Figura 4.5.5. El aspecto macroscópico del hígado tras el tratamiento con anticuerpo agonista de CD40 sugiere hepatotoxicidad 1376

Figura 4.5.6. La administración del anticuerpo agonista de CD40 reduce la expresión de F4/80 en los macrófagos residentes de la CP 1387

Figura 4.5.7. El anticuerpo agonista de CD40 inhibe la expresión de RELM-α en los macrófagos de la CP..... 139

Figura 4.5.8. El anticuerpo agonista de CD40 inhibe la proliferación de los macrófagos de la CP..... 1421

Figura 4.5.9. La administración del agonista de CD40 potencia la expresión de CD80, ICAM-1 y MHCII en macrófagos, y este efecto es potenciado por la IL-4, al menos para CD80 y MHCII 1432

Figura 4.6.1. Diagrama de los experimentos de infección con *H. polygyrus* 145

Figura 4.6.2. El bloqueo de CD40L al día seis post infección favorece un aumento en la carga parasitaria en ratones infectados con H. polygyrus..... 146

Figura 4.6.3. El análisis multidimensional de los tipos celulares presentes en la CP no revela efectos del bloqueo de CD40L en ratones infectados con *H. polygyrus*..... 147

Figura 4.6.4. El análisis multidimensional de los marcadores de trayectorias de macrófagos en la totalidad de las células de la CP no revela efectos del bloqueo de CD40L en ratones infectados con *H. polygyrus*..... 148

Figura 4.6.5. Durante la infección por *H. polygyrus* aumenta la cantidad de macrófagos en la CP..... 149

Figura 4.6.6. Durante la infección por *H. polygyrus* aumenta la expresión de CD40L en la superficie de las células T $CD4^+$ de la CP 1510

Figura 4.6.7. Durante la infección por *H. polygyrus* aumenta la expresión de MHCII en la superficie de los LPM..... 151

Figura 4.6.8. El bloqueo de CD40L potencia la expresión de Ym1 en los macrófagos de la CP durante la infección por *H. polygyrus* 1543

Figura 4.6.9. El bloqueo de CD40L potencia la proliferación de los LPM durante la infección por *H. polygyrus*..... 1565

Figura 4.6.10. El análisis multidimensional de algunos de los tipos celulares presentes en el hígado no revela efectos del bloqueo de CD40L en ratones infectados con *H. polygyrus*..... 157

Figura 4.6.11. El bloqueo de CD40L no altera el reclutamiento de células en el hígado inducido por la infección *H. polygyrus* 158

Figura 4.6.12. Durante la infección por *H. polygyrus* no se modifica la expresión de CD40L en las células T $CD4^+$ hepáticas 159

Figura 4.6.13. El bloqueo de CD40L no modifica la proliferación de las KC durante la infección por *H. polygyrus*..... 160

Figura 4.7.1. La suplementación de cultivos de células totales de la CP con fluidos de la CP no habilita a los macrófagos presentes en condiciones basales a proliferar en respuesta a IL-4 163

Figura 4.7.2. La suplementación de cultivos de células totales de la CP con el fluido de la CP de ratones vírgenes no habilita a los macrófagos presentes en condiciones inflamatorias a proliferar en respuesta a IL-4..... 1654

Figura 4.7.3. En condiciones de hipoxia severa in vitro, los macrófagos de la CP basal no proliferan y presentan una menor inducción de la expresión de marcadores M(IL-4) .. 166

Figura 4.7.4. En condiciones de hipoxia moderada in vitro, los macrófagos de la CP basal e inflamatoria no proliferan en respuesta a IL-4 y presentan una menor inducción de la expresión de RELM-α..... 167

Figura 5.1. Modelo de posibles mecanismos que explican la inhibición de la proliferación y polarización M(IL-4) de los macrófagos de la CP durante la infección por *H. polygyrus* 178

Figura 5.2. Resumen del impacto de los distintos agonistas de CD40 en las respuestas de los macrófagos a la IL-4 184

Figura 5.3. Modelo de posible participación de la interacción CD40L-CD40 en el ingreso de células T V a la CP 187

Figura 5.4. Modelo de retención temporal de las células T V a la CP 189

1 Introducción

1.1 Respuestas inmunitarias de tipo 2

1.1.1 Generalidades de las respuestas de tipo 2

Las respuestas inmunes de tipo 2 son esenciales para la defensa frente a parásitos helmintos, pero también participan en la patogenia de diversas enfermedades alérgicas, como el asma, la rinitis alérgica y la dermatitis atópica (1,2). Este tipo de respuesta se caracteriza por la producción de citoquinas como las interleuquinas (IL-) 3, 4, 5, 9 y 13, la inducción de anticuerpos de los isotipos IgG1 en ratón, IgG4 en humanos e IgE en ambos, y la expansión de poblaciones de eosinófilos, basófilos, mastocitos y macrófagos "alternativamente activados" o M2, que se describirán en la sección 1.2.2 (3,4). Además, las células T $CD4^+$ con polarización Th2 desempeñan un rol central en estas respuestas, al ser productoras de las citoquinas mencionadas, así como de quimiocinas clave, como CCL11, fundamental en el reclutamiento de eosinófilos (5). Estudios en modelos murinos han demostrado que los ratones deficientes en células T $CD4^+$ no desarrollan una respuesta inmune protectora tras la vacunación contra *Schistosoma mansoni,* ni son capaces de expulsar al helminto intestinal *Nippostrongylus brasiliensis*, defectos que pueden revertirse mediante la transferencia adoptiva de células T $CD4^+$ productoras de IL-4 (6). Las células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2) también contribuyen a las respuestas de tipo 2 mediante la producción de citoquinas, especialmente IL-5 e IL-13, en respuesta a señales de daño epitelial. Entre estas señales se encuentran la IL-25, IL-33 y la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), conocidas como alarminas por su capacidad de actuar como señales tempranas tras el daño tisular, favoreciendo la activación de respuestas Th2 (7).

Particularmente la IL-4 y la IL-13 son centrales en la respuesta tipo 2 y pueden ser producidas tanto por células del sistema inmune innato como adaptativo, incluyendo como se mencionó antes a ILC2 y células Th2 (8–12). Estas dos citoquinas señalizan por receptores que comparten una de sus subunidades, la subunidad alfa del receptor de la IL-4 (IL-4Rα), e inician la transducción de señales a través de las vías de señalización JAK/STAT (13,14). Los ratones deficientes en IL-4Rα, STAT6 o GATA3, un factor de transcripción fundamental para que las células T $CD4^+$ se diferencien hacia el linaje Th2, presentan una inmunidad antihelmíntica notablemente reducida (15–18).

Independientemente de su origen celular, las citoquinas de tipo 2 activan una amplia variedad de mecanismos efectores posteriores (4). En el intestino, las

células epiteliales expresan IL-4Rα (19), lo que favorece la diferenciación de células caliciformes productoras de mucus (20) y la producción de RELM-β, una proteína con actividad antihelmíntica directa (21,22). Además, la activación del IL-4Rα estimula la hipercontractilidad del músculo intestinal (23) y promueve la renovación del epitelio (24), contribuyendo así a la expulsión de los gusanos residentes en el intestino. La IL-4 e IL-13 promueven también la polarización M2 de macrófagos, característica de las respuestas Th2, lo que conduce a la expresión de marcadores distintivos y a funciones efectoras que contribuyen a la eliminación de parásitos helmintos y la reparación de los tejidos (25).

En los tejidos no mucosos, la respuesta inmune tipo 2 se orienta a la destrucción de los parásitos más que a su expulsión, e involucra una amplia variedad de células inmunes innatas, así como la opsonización por anticuerpos (4). Durante las etapas larvarias, la interacción de IgE con receptores Fc en los eosinófilos promueven la desgranulación y liberación de mediadores tóxicos que colaboran en la muerte del parásito (26). Además, los eosinófilos son capaces de producir IL-4 en etapas tempranas de la respuesta inmune (27) y actúan como participantes activos y amplificadores de la inmunidad de tipo 2 (8,28,29). Los basófilos, también producen IL-4, impulsan la polarización hacia una respuesta Th2 y contribuyen a la eliminación de parásitos durante infecciones helmínticas, tanto en modelos murinos como en humanos (25,30).

Durante las infecciones por helmintos, los hospederos utilizan múltiples mecanismos para regular la respuesta inmunitaria y evitar que el sistema inmune destruya al propio cuerpo. Estos mecanismos incluyen la reducción de la concentración de antígeno a medida que se controla la infección, la liberación de IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) y la amplificación de células T reguladoras (Tregs) (31,32). Las células Tregs $FOXP3^+$ expresan varias moléculas de superficie que desempeñan papeles clave en la regulación negativa de la respuesta inmunitaria, como CD25, la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el coestimulador de células T inducible (ICOS) y el inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT) (33). En estudios con modelos experimentales por infección con helmintos en ratones, se ha observado una expansión notable de las células Tregs y células B reguladoras (Bregs) durante la infección. Por ejemplo, en ratones infectados con *Heligmosomoides polygyrus*, las células Tregs $FOXP3^+$ no solo aumentan en frecuencia respecto a animales no infectados, sino que también muestran mayor expresión de CD103 (subunidad αE de integrina), que les confiere una alta capacidad supresora (34,35). Por otro lado, diversas infecciones helmínticas han demostrado atenuar condiciones inflamatorias alérgicas y autoinmunes (36–39). Si bien es posible que estas células reguladoras actúen para limitar la patología inducida por los parásitos, también se

ha observado que los helmintos vivos, pero no los muertos, promueven la expansión de células Tregs (40), y que secretan factores capaces de inducir la conversión de células T vírgenes en Tregs funcionales (41). Esto sugiere que la activación de vías inmunorreguladoras no es simplemente una respuesta del sistema inmune al daño inflamatorio, sino una estrategia activa del parásito para modular la inmunidad del hospedador (42,43).

1.1.2 *Heligmosomoides polygyrus*, un modelo biológico para el estudio de la respuesta de tipo 2

H. polygyrus es un parásito nematodo intestinal que se encuentra en poblaciones de ratones silvestres y que ha sido transferido con éxito al laboratorio, lo que lo convierte en un modelo excelente para estudiar la inmunología de las infecciones por helmintos gastrointestinales en humanos y ganado (44). En un entorno experimental, *H. polygyrus* se introduce en ratones mediante la administración oral de larvas infectivas en estadio 3 (L3), y tiene un ciclo de vida estrictamente entérico. Tras la ingestión, en un plazo de 24 horas, las larvas penetran a través de la mucosa hasta llegar a la submucosa del intestino delgado. Allí, sufren dos mudas y emergen nuevamente hacia el lumen como gusanos adultos, los cuales se alimentan del tejido intestinal del hospedero (45). Los gusanos adultos se adhieren a las vellosidades del intestino delgado, donde se enrollan, se reproducen y producen huevos que son eliminados en las heces. En el ambiente externo, los huevos eclosionan y atraviesan dos mudas, convirtiéndose en larvas infectivas L3, lo que permite que el ciclo de vida continúe (Figura 1.1). La infección de *H. polygyrus* en el ratón se puede medir ya sea por el conteo de gusanos adultos en el intestino o por determinación de la cantidad de huevos liberados en las heces (44).

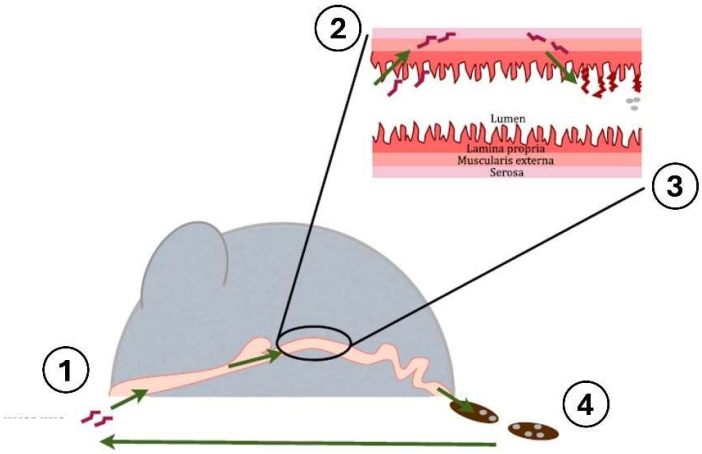


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Heligmosomides polygyrus* en ratones.1. Una vez ingeridas, las larvas atraviesan el tracto digestivo y alcanzan el intestino delgado. **2.** Dentro de las 24 horas posteriores a la ingestión, las larvas penetran la pared del intestino delgado y alcanzan la submucosa, donde realizan dos mudas. **3.** Hacia el décimo día después de la ingestión, los gusanos adultos regresan al lumen intestinal, donde se aparean y las hembras liberan huevos. **4.** Los huevos se eliminan del hospedero a través de las heces. En el ambiente externo, las larvas emergen de los huevos y mudan dos veces antes de volverse infecciosas. Figura tomada y modificada de (44).

En infecciones primarias, el tiempo durante el cual *H. polygyrus* puede persistir y el grado de respuesta que provoca en diferentes cepas de ratones muestran una variación considerable. Se ha descrito que la capacidad de respuesta de las distintas cepas depende de factores genéticos, entre ellos el locus del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) H-2. La cepa C57BL/6 se considera de sensibilidad intermedia, tardando entre 8 y 20 semanas en expulsar los gusanos (44).

La infección por *H. polygyrus* desencadena una respuesta altamente polarizada a Th2, la cual es esencial para el control y la expulsión del parásito (46). En la infección primaria por *H. polygyrus*, se observa la expresión de IL-3, IL-4, IL-5 e IL-9 en los ganglios mesentéricos y las placas de Peyer (47). La IL-4 es la citoquina más importante para la protección, tanto en infecciones primarias como secundarias por *H. polygyrus*, siendo necesaria tanto en la expulsión de los gusanos adultos como en la inhibición de la producción de huevos (46). La inmunidad frente a una infección secundaria se ve reducida al bloquear la IL-4 mediante el uso de anticuerpos, y se pierde por completo cuando se inhibe el IL-4Rα (46). Esto sugiere que la IL-13, que también actúa a través de IL-4Rα, puede compensar parcialmente la falta de IL-4, pero en ausencia de la señalización de ambas citoquinas, la protección contra la reinfección por *H. polygyrus* se pierde. Por otro lado, el bloqueo de IL-5 mediante tratamiento con anticuerpos no afecta la expulsión de los gusanos

en una infección secundaria (46). En experimentos en los que se administra IL-4 en complejo con un anticuerpo anti IL-4 (IL-4c) para prolongar su actividad biológica, los ratones BALB/c expulsan *H. polygyrus* más rápidamente que controles que no recibieron IL-4c (48). Este efecto no depende del sistema inmune adaptativo, ya que también se observa que el tratamiento con IL-4c reduce considerablemente la producción de huevos y facilita la eliminación de gusanos, tanto en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID), como en ratones tratados con anticuerpos anti CD4 (48). Por otro lado, se ha reportado que, tras la infección primaria, las células T $CD4^+$ con potencial de producir IL-4 (células Th2) se distribuyen por diversos sitios cuerpo, llegando a órganos linfoides y no linfoides, como las vías respiratorias, la cavidad peritoneal (CP) y el hígado (49,50). Estos resultados podrían ser indicio de la presencia de reservorios periféricos de células T memoria Th2 de vida prolongada, listas para actuar ante futuras infecciones.

Las células del sistema inmune innato responden inicialmente a *H. polygyrus* y contribuyen a la expulsión de los parásitos mediante la liberación de citoquinas tipo 2 y mecanismos que dañan o eliminan a los gusanos. Entre ellas se destaca la presencia de células dendríticas (DC), macrófagos M2, eosinófilos y basófilos. Los macrófagos M2 cumplen un rol esencial en la protección frente a reinfecciones por *H. polygyrus*. Cuando se eliminan estos macrófagos con liposomas cargados con clodronato o se inhibe la actividad de la Arginasa-1 (una enzima producida específicamente por este tipo de macrófagos), los ratones pierden la capacidad de expulsar al parásito (25).

En cuanto al papel de la respuesta humoral contra *H. polygyrus*, estudios con ratones deficientes en células B han demostrado que la producción de IgE es prescindible para la protección y la IgA cumple un papel secundario, mientras que la IgG es la principal clase de anticuerpos responsable de la protección (51). La transfusión de suero con alta actividad de IgG1 específica contra el parásito reduce significativamente la cantidad de gusanos adultos en animales infectados (52).

Por otro lado, las células Tregs y Bregs, que producen IL-10 y TGF-β, modulan la respuesta inmunitaria contra *H. polygyrus* para prevenir daños excesivos, pero también pueden facilitar la persistencia del parásito (35,53,54).

1.2 Macrófagos

1.2.1 Generalidades sobre los macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas del sistema inmune innato, altamente plásticas y capaces de adaptar su función según las señales del entorno y el contexto fisiopatológico. Entre sus funciones se incluyen procesos homeostáticos como la eliminación de células muertas, así como funciones claves en la vigilancia inmunológica, la defensa frente a infecciones, la reparación de tejidos y la resolución de procesos inflamatorios (55).

En ratones, los macrófagos presentes en la mayoría de los compartimentos del organismo, incluyendo el cerebro, la piel, el hígado, los riñones, los pulmones y el corazón, se originan a partir del saco vitelino o del hígado fetal (56,57). En condiciones fisiológicas y en ausencia de estímulos inflamatorios, su mantenimiento en la edad adulta se lleva a cabo mediante proliferación local, regulada homeostáticamente por la disponibilidad del factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (M-CSF) (58). Sin embargo, en grados diferentes según el compartimiento, también existe sustitución de los macrófagos de origen embrionario por macrófagos derivados de monocitos circulantes que se diferencian *in situ* (58). De esta forma, en muchos tejidos adultos, la población residente de macrófagos es una combinación de células derivadas del desarrollo embrionario y de precursores monocíticos circulantes (56,57). En el otro extremo, en el tracto gastrointestinal, los macrófagos derivan predominantemente de monocitos circulantes, con muy baja contribución de células de origen embrionario (58).

El M-CSF, también conocido como CSF1, actúa a través de su receptor CSF1R y es fundamental para el mantenimiento, la supervivencia, la diferenciación y la proliferación de macrófagos, tanto de origen embrionario como hematopoyético en los tejidos (59). Este factor es producido constitutivamente por células mesenquimales, y puede presentarse en forma unida a membrana, como glicoproteína secretada o como proteoglicano (60). Durante procesos inflamatorios, niveles elevados de M-CSF estimulan la proliferación de macrófagos, facilitando su ocupación de nichos tisulares y contribuyendo a mantener el equilibrio de la población (58,61,62).

1.2.2 Polarización de macrófagos

Los macrófagos pueden polarizarse hacia diferentes subtipos funcionales, en respuesta a estímulos del entorno, como quimioquinas, citoquinas y ligandos de los receptores tipo Toll (TLR) (63). Los fenotipos de macrófagos reconocidos convencionalmente son los denominados M1 y M2. No obstante, M1 y M2 representan los extremos de un continuo de activación, que incluye una amplia variedad de respuestas funcionales moduladas por las condiciones específicas del entorno. Los macrófagos activados clásicamente, o M1, se generan en respuesta a citoquinas proinflamatorias de tipo 1 como el IFN-γ, y a agonistas de estímulos microbianos como el LPS o el ADN bacteriano rico en secuencias CpG. Se caracterizan por la expresión aumentada de marcadores como CD80, CD86 y CD16/32, así como por la producción de compuestos microbicidas, entre ellos óxido nítrico (por su sigla en inglés, NO) y especies reactivas de oxígeno, y la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-12 y TNF-α. Estas características les permiten desempeñar un rol clave en la eliminación de patógenos intracelulares como *Leishmania* y *Salmonella spp* (64).

Actualmente se considera que el término M2 es insuficiente como definición, ya que abarca a fenotipos diversos, inducidos por diferentes estímulos (65,66). Por esta razón, se prefiere nombrar a los fenotipos de macrófagos según el estímulo que indujo su diferenciación. Así, el subtipo de M2 mejor definido y estudiado es el que se genera en respuesta a IL-4 y/o IL-13, denominado M(IL-4), término que se utilizará en esta tesis (65–69). En general, los macrófagos M(IL-4) son necesarios para la eliminación efectiva de diversos helmintos, incluidos *H. polygyrus*, *N. brasiliensis*, *S. mansoni* y *Brugia malayi*, donde contribuyen tanto a la destrucción del parásito como a la reparación tisular y la regulación de la respuesta inmune (70–75).

La IL-4 y la IL-13 no solo favorecen la polarización M(IL-4) de los macrófagos, sino que también promueven su proliferación, como se ha demostrado en algunas infecciones por helmintos (61,76,77). La administración exógena de IL-4 también induce la proliferación de macrófagos, en todos los órganos o sitios anatómicos evaluados hasta el momento, incluyendo CP , cavidad pleural, hígado, bazo, y tejido adiposo (61,76–79).

Los macrófagos M(IL-4) se caracterizan por la expresión de marcadores como Arginasa-1, la proteína similar a quitinasa-3 Chil3 (también llamada Ym1) y la molécula similar a resistina α (RELM-α;, también conocida como FIZZ1), entre otros (80–82).

La Arginasa-1 contribuye directamente a la regulación y reparación de heridas, ya que su actividad genera prolina, que es esencial para la síntesis de colágeno, y poliaminas para el crecimiento celular (83). Además, esta enzima compite por su sustrato, la L-arginina, con la sintasa de óxido nítrico inducible (NOS-2; también llamada iNOS), cuya expresión se asocia a la activación clásica de macrófagos, por lo que se postula que habría una inter-regulación negativa entre ambos tipos de activación (84).

Ym1 es miembro de una familia de proteínas de mamíferos con homología con las quitinasas de organismos inferiores (85). Originalmente, Ym1 fue identificada como un factor quimiotáctico para eosinófilos (86,87), pero su elevada producción por parte de los macrófagos y su capacidad para unirse a la quitina y a otras estructuras glucídicas (88,89) sugieren que la quimiotaxis de eosinófilos no constituye su papel principal. Se ha observado que Ym1 también puede ser expresada por neutrófilos (90,91). Se postula que Ym1 podría tener una función defensiva al unirse a hongos u otros patógenos que contienen quitina; sin embargo, al carecer de actividad quitinasa, sus mecanismos efectores permanecen poco definidos (92). Además, gracias a su capacidad de unirse a heparina, un glicano abundante en la superficie celular y en la matriz extracelular, Ym1 también podría mediar interacciones célula-célula o célula-matriz de manera similar a las selectinas (88). También, se ha propuesto que Ym1 participa en el depósito de matriz extracelular durante el proceso de reparación tisular (89).

La función de RELM-α está aún menos definida que las de las proteínas antes mencionadas. Holcomb y colaboradores fueron los primeros en reportar a RELM-α como una proteína abundantemente secretada en el lavado broncoalveolar de un modelo murino de asma (93). Observaron que el epitelio pulmonar inflamado secretaba RELM-α y demostraron que esta proteína podía inhibir la acción del factor de crecimiento nervioso (NGF) *in vitro* (93). Los mayores niveles de producción de RELM-α se verifican en macrófagos estimulados por IL-4, tanto *in vivo* como *in vitro* (67,82,94), aunque también puede ser expresada por células del epitelio pulmonar como se mencionó (93) y por eosinófilos (95). Se ha propuesto su participación en el depósito de matriz extracelular en un modelo animal de fibrosis pulmonar (96). Por lo tanto, tanto RELM-α como Ym1 podrían participar en la función de reparación tisular de los macrófagos activados por citoquinas tipo 2.

Los macrófagos M(IL-4) comparten características con los macrófagos asociados a tumores (TAMs), los cuales favorecen el crecimiento tumoral y la metástasis, y se correlacionan con pronósticos desfavorables. En contraste, los macrófagos M1 se consideran, en general, efectores con capacidad citotóxica frente a células tumorales, con funciones antitumorales y de estimulación inmunológica. Por lo

tanto, la reprogramación de TAMs con fenotipo M(IL-4) hacia un perfil M1 con actividad antitumoral representa una estrategia terapéutica prometedora (97).

1.3 Aspectos generales de la cavidad peritoneal

La CP es un espacio lleno de líquido que contiene la mayoría de los órganos abdominales, como el estómago, los intestinos y el hígado. Se encuentra revestida por el peritoneo, la membrana serosa más extensa del cuerpo, con una superficie comparable a la de la piel. Esta membrana está compuesta por el mesotelio, un epitelio de origen mesodérmico, una membrana basal y tejido conectivo submesotelial (98). El peritoneo parietal recubre la superficie interna de la pared abdominal, mientras que el peritoneo visceral se continúa con las capas serosas de los órganos intra-abdominales. Una doble capa de peritoneo forma el mesenterio, que conecta los órganos digestivos abdominales con la pared abdominal y actúa como vía de paso para vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos. Las células mesoteliales secretan una pequeña cantidad de líquido peritoneal que actúa como lubricante dentro de la CP, evitando la fricción mecánica entre los órganos. En ratones adultos, el volumen total de líquido peritoneal en estado basal se estima en aproximadamente 50–100 µL (99,100). El drenaje del líquido peritoneal hacia el sistema linfático permite su recirculación (101), y se lleva a cabo a través de aberturas en el mesotelio denominadas estomas, que se localizan principalmente en el omento (98). El omento es un tejido adiposo visceral que se desarrolla a partir del crecimiento del mesenterio, y contiene un sistema vascular especializado junto con tejido linfoide organizado. Se le atribuye un papel importante en la defensa frente a infecciones peritoneales (102).

La CP es vulnerable principalmente a infecciones y metástasis tumorales, que se asocian con una alta mortalidad debida a la rápida diseminación intra-abdominal y las limitaciones anatómicas que dificultan su tratamiento. La defensa inicial frente a estos desafíos recae en las células inmunes residentes, que actúan como una primera barrera de detección y respuesta (103). La segunda línea de defensa está constituida por estructuras de tejido linfoide funcional localizadas en el tejido adiposo del omento, conocidas como cúmulos linfoides asociados al tejido adiposo (FALCs, por sus siglas en inglés *fat-associated lymphoid clusters*), también denominados "*milky spots*" (Figura 1.2) (102). Estas estructuras presentan una organización similar a la de los órganos linfoides secundarios, incluyendo un estroma basado en células reticulares y zonas diferenciadas para células B y T, y tienen vasos especializados que facilitan el tránsito de leucocitos hacia y desde el omento y su posterior paso a la CP (102).

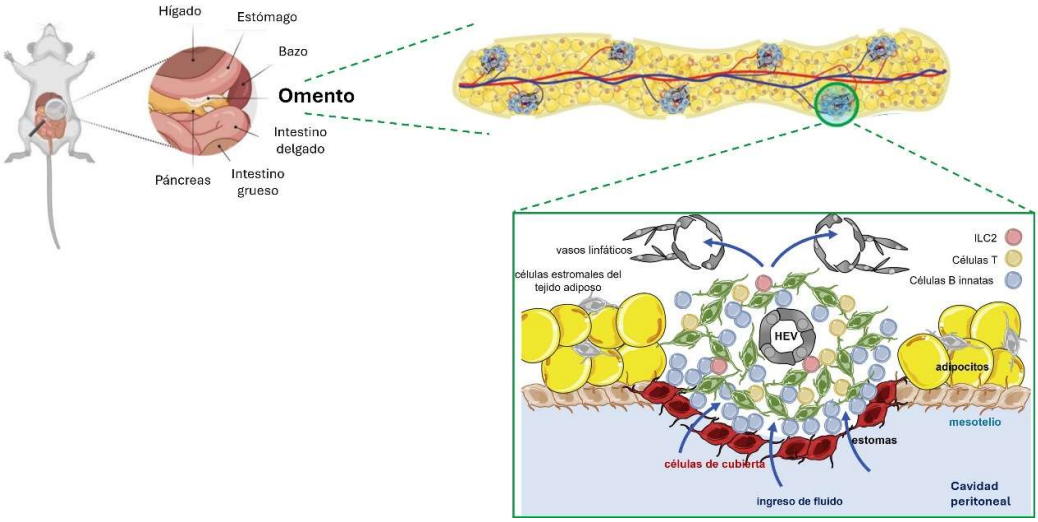


Figura 1.2. Representación del omento y FALC en ratones. El omento en ratones es una fina franja de tejido adiposo visceral especializado en la CP, conectada por una capa mesotelial al bazo, el estómago, el intestino grueso y el páncreas. En él se encuentran los *milky spots*, también conocidos como FALC, que son agregados de leucocitos incrustados en el tejido adiposo. Estas estructuras son similares a los ganglios linfáticos, ya que captan y responden a antígenos locales. Sin embargo, la composición celular de los FALC en condiciones basales se asemeja a la de la CP. Las células y los antígenos pueden atravesar la capa mesotelial en los FALC, a través de aberturas denominadas estomas, formadas entre células mesoteliales especializadas denominadas células de cubierta. Figuras extraídas y modificadas de (104–106).

En estado basal, los macrófagos peritoneales grandes (LPM, por su sigla en inglés *large peritoneal macrophages*) junto con las células B1, representan la mayoría de las células obtenidas mediante lavado peritoneal. Otras poblaciones presentes en menor proporción son los macrófagos peritoneales pequeños (SPM, por su sigla en inglés *small peritoneal macrophages*), las células B2, T, NK, linfoides innatas, eosinófilos y mastocitos (107). Estudios recientes han demostrado que los LPM participan en funciones homeostáticas, de reparación y defensa inmunológica (107). Por su parte, las células B1, consideradas como células B de tipo innato, producen constitutivamente anticuerpos naturales IgM que ofrecen protección local frente a una amplia variedad de patógenos incluidos virus, bacterias, hongos y parásitos (108).

Los LPM y las células B1 dependen de señales provenientes de las células estromales del omento para su diferenciación, supervivencia y función. En particular, el ácido retinoico, generado por células mesoteliales y estromales fibroblásticas del omento, promueve la diferenciación de los LPM (109). Las células estromales del omento también expresan IL-33 (110,111), que actúa sobre células Th2 locales, ILC2, macrófagos y células Tregs (112–118) asociadas al tejido adiposo,

todas ellas abundantes en el omento y relacionadas con la inmunidad tipo 2, la regulación de la respuesta inmune y funciones de reparación.

1.3.1 Macrófagos de la cavidad peritoneal

En condiciones de homeostasis, la CP contiene numerosas células fagocíticas mononucleares, principalmente macrófagos, que se dividen en dos grandes subpoblaciones: los LPM y SPM. Estas subpoblaciones tienen sus análogos en las otras cavidades serosas, lo que da origen a los términos más generales LCM y SCM (macrófagos grandes y pequeños de las cavidades, respectivamente; del inglés *large cavity macrophages* y *small cavity macrophages*).

Los LPM constituyen la población predominante de macrófagos de la CP y son considerados residentes tisulares (109,119). Durante la vida adulta, su repertorio se mantiene, en estado basal, mediante una combinación de autorrenovación de los LPM residentes sembrados desde el período embrionario y de la diferenciación a partir de células derivadas de monocitos y posterior autorrenovación de los LPM así generados. Tras la madurez sexual, la tasa de reemplazo de LPM embrionarios por LPM derivados de monocitos es mayor en machos que en hembras; en forma contraintuitiva, en machos los LPM muestran una mayor actividad proliferativa que en hembras (120,121).

Los LPM/LCM se identifican por su perfil $CD11b^{+}$ $F4/80^{alto}$ $MHCII^{-/bajo}$ y expresan múltiples receptores de superficie que reflejan sus funciones homeostáticas, reparadoras, regulatorias y defensivas. Entre ellos se incluyen moléculas implicadas en su adhesión y localización (ICAM-2, CD11b, CD49f, CD73 y CD62P) (109), en el reconocimiento y eliminación de células muertas (CD36, CD93, CD163, Tim4, MerTK, MARCO y MSR1), en la unión a patógenos (CD14, CD36 y SIGN-R1), y en la respuesta frente a ellos (distintos TLR) (99,122–125). Además, expresan marcadores característicos de macrófagos residentes tisulares, como CD14, CD64 y MerTK (122,126), así como el factor de transcripción GATA6 que es inducido por el ácido retinoico (109), y el receptor barrendero Tim4, características compartidos con otros macrófagos presentes en cavidades serosas como la pleural y la pericárdica (107,127). Estas características sugieren que una función principal de estas células es la eliminación de células apoptóticas y senescentes (107). Asimismo, los LPM expresan altos niveles de CXCL13. Esta quimioquina es ligando de CXCR5, receptor altamente expresado por las células B1, y resulta fundamental para la localización de estas células en las cavidades serosas (128). Además de

estas funciones homeostáticas, en contextos inflamatorios, los LPM actúan como centinelas del sistema inmune innato, respondiendo rápidamente mediante el reclutamiento de otras células efectoras innatas, como los neutrófilos, tal como se ha observado en modelos de peritonitis aguda inducida por zimosán o medio tioglicolato envejecido (129–132).

En contraste, los SPM/SCM son células de vida corta, que derivan de monocitos Ly-6C^{alto}, los cuales ingresan a la cavidad de manera dependiente de CCR2 y requieren del factor regulador de interferón 4 (IRF4) para su maduración (133). Los SPM se caracterizan por una menor expresión de CD11b y F4/80 que los LPM, junto con una alta expresión basal de MHCII (134). Además, expresan basalmente RELM-α (133), cuya expresión se eleva algo más en entornos con polarización de tipo 2. Adicionalmente, el receptor de membrana plasmática de familia inmunoglobulina CD226 (DNAM-1) se ha establecido como un marcador útil para distinguir macrófagos maduros F4/80^{bajo} MHCII^{+} en las cavidades serosas en condiciones homeostáticas de los macrófagos inflamatorios (133,135,136).

Mientras que se acepta que los LPM/LCM son macrófagos tisulares residentes, fácilmente distinguibles en base a altos niveles de F4/80 o expresión de MerTK o Tim4, la composición de la población F4/80^{bajo} MHCII^{+}, que incluye a los SPM/SCM, ha generado controversia (119,134,136,137). Esto se debe en parte a los distintos métodos usados para caracterizarlas y al hecho de que el marcador CD11c, antes considerado exclusivo de DC, también se expresa en varios macrófagos, incluidos los de cavidades (133,135–137). Estudios recientes han propuesto el uso de CSF1R como marcador universal para los macrófagos de cavidades serosas, separándolos de las DC (125,137,138). Cabe destacar que, a diferencia de otros tejidos donde es difícil detectar la proteína CSF1R, en las células de la CP ésta se puede identificar fácilmente en la superficie celular, probablemente debido a la ausencia de necesidad de digestión proteolítica previo al análisis (107). Sin embargo, mediante el uso de ratones reporteros *Zbtb46*-GFP, ampliamente empleados para identificar DC (139,140), se ha observado que las células CSF1R^{+} F4/80$^{-/bajo}$ MHCII^{+} de la CP incluyen una pequeña fracción de DC (141). Por ello, la expresión de RELM-α intracelular o la de CD226 (DNAM-1) se consideran las mejores formas de distinguir a los macrófagos del componente de DC dentro de las células CSF1R^{+} F4/80$^{-/bajo}$ MHCII^{+} en la CP en condiciones homeostáticas (107,136).

Las funciones homeostáticas de los SPM se conocen menos que la de los LPM. En comparación con los LPM, los SPM parecen tener menor capacidad para fagocitar células apoptóticas (142), pero mayor capacidad para captar bacterias y producir NO en respuesta a la estimulación con LPS *in vivo* (134). Además, su alta expresión

de MHCII y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 sugiere un rol en la presentación de antígenos (136). Por otro lado, además de cumplir funciones como tales, los SPM podrían actuar como precursores de los LPM, es decir funcionar como células intermedias en el camino de diferenciación de LPM a partir de monocitos (107,135,143).

Las reacciones inflamatorias en la CP, inducidas por la inyección intraperitoneal (i.p.) de sustancias que actúan como estímulos estériles (100,121,144–146), cirugías abdominales (144) o infecciones bacterianas (147), se han asociado con un aumento en el reclutamiento de monocitos, que se diferencian a macrófagos inflamatorios (IMacs) (133). Estos se caracterizan por una baja expresión de F4/80 y ausencia de expresión de otros marcadores de LPM tales como MerTK y Tim4, características compartidas con los SPM presentes en condiciones basales. Por esta razón, algunos autores llaman "SPM" a los IMacs F4/80^{bajos} (143,148). Los autores que llaman a los IMacs F4/80^{bajos} SPM (y SCM a sus contrapartes de la cavidad pleural) también distinguen una población llamada CPM o CCM (del inglés *converting peritoneal macrophages* o *converting cavity macrophages*), considerada intermedia en la diferenciación a LPM/LCM derivados de monocitos en condiciones inflamatorias y caracterizada por expresión intermedia de F4/80 y expresión de MHCII (143,148). Pese a sus similitudes con los SPM/SCM en sentido estricto, los iMacs no expresan RELM-α en ausencia de IL-4/IL-13, no expresan CD226 (DNAM-1), expresan niveles variables de MHCII, y más generalmente poseen un perfil transcripcional diferencial (107,136).

La función de los IMacs durante la peritonitis continúa siendo poco comprendida; sin embargo, se ha demostrado que producen altos niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF-α e IL-1β (149). Además, presentan una mayor capacidad para fagocitar partículas microbianas que los LPM (150,151), lo que sugiere que cumplen un papel relevante en la eliminación bacteriana (149).

Frente a estímulos inflamatorios, además del reclutamiento de IMacs, los LPM residentes dejan de recuperarse transitoriamente en los lavados peritoneales, en un fenómeno conocido como "reacción de desaparición de los macrófagos" (MDR, por sus siglas en inglés *macrophage disappearance reaction*) (152). Aunque el destino de estos LPM no se comprende completamente, algunos estudios indican que la administración i.p. de zimosán o *E. coli* induce el agrupamiento de los LPM sobre la pared mesotelial de la CP (100). En forma coincidente, se ha observado que, tras un desafío inflamatorio, aumenta la expresión de integrinas en los LPM, lo que favorece su adhesión a la pared mesotelial y guía su emigración hacia el omento (102,153).

Tras el cese del estímulo inflamatorio, la recuperación del repertorio de los LPM ocurre mediante proliferación de los LPM restantes (145) y el reemplazo por los IMacs, que eventualmente llegan a adquirir características de LPM residentes (144,146,154). Usando un modelo experimental de inflamación por zimosán, leve o severa, Jenkins y colaboradores mostraron que tanto el grado de reemplazo como la capacidad de los IMacs para adquirir las características de los LPM residentes dependen de la magnitud de la inflamación y del nivel de muerte celular (146). La Figura 1.3 esquematiza el origen y la dinámica de reemplazo de los LPM bajo homeostasis e inflamación. Por otro lado, durante la peritonitis inducida por medio tioglicolato (125) o zimosán (136) parecen mantenerse en la cavidad células con fenotipo de SPM en el sentido estricto. Si bien esto no está completamente dilucidado, experimentos de transferencia adoptiva de células sugieren que no se trataría de las mismas células presentes previo al inicio de la inflamación, sino de células recientemente reclutadas (136). De ser así, podrían existir destinos diferentes para los monocitos que ingresan a la cavidad inflamada, de forma que una parte daría lugar a los IMacs, que posteriormente podrían adquirir características de LPM, mientras que otra parte daría origen a SPM en el sentido estricto, tal como ocurre en condiciones basales. A su vez, no se puede descartar que los SPM en sentido estricto presentes en condiciones inflamatorias den lugar a LPM, en forma similar a lo que ocurre en condiciones basales.

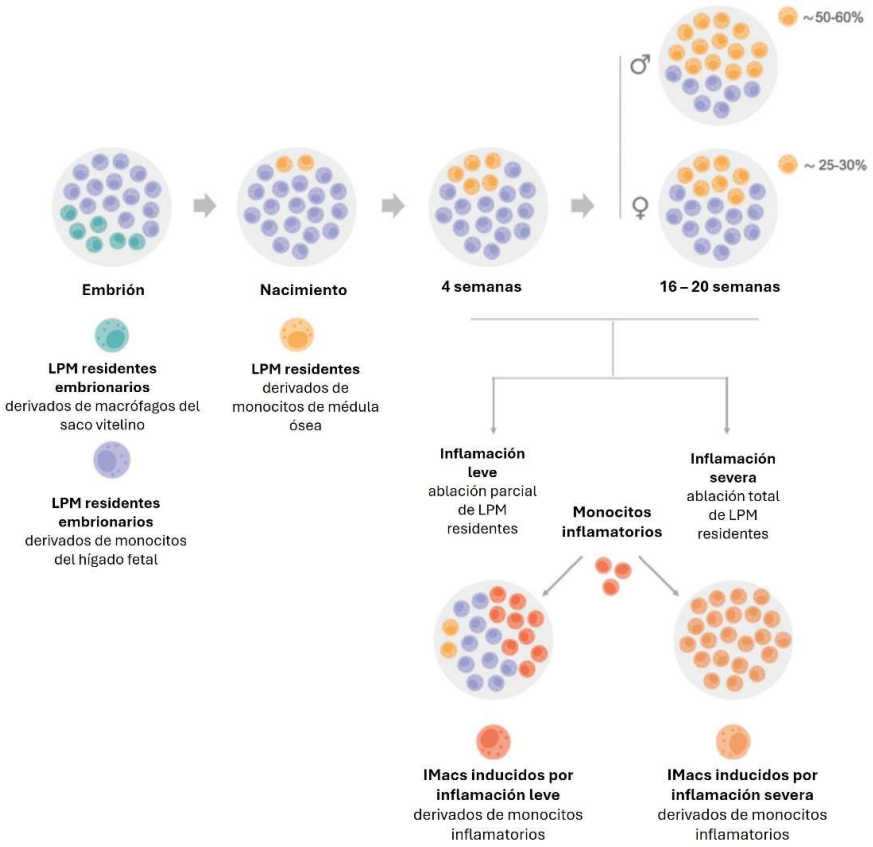


Figura 1.3. Modelo del origen y reemplazo de los LPM en condiciones de homeostasis e inflamación. Los LPM se diferencian durante la vida embrionaria y se mantienen en la vida adulta mediante autorrenovación *in situ*. Los LPM residentes de origen embrionario derivan de una contribución dual de macrófagos del saco vitelino y monocitos del hígado fetal, o exclusivamente de monocitos del hígado fetal. Estos LPM embrionarios son reemplazados de forma gradual, por LPM residentes derivados de monocitos, que adquieren una identidad similar a la de los LPM embrionarios, pero conservan ciertas características funcionales y transcripcionales propias de su origen. Durante la madurez sexual hay a un reemplazo sexualmente dimórfico de los LPM embrionarios por LPM residentes derivados de monocitos, siendo la tasa de reemplazo mayor en machos que en hembras. Las reacciones inflamatorias en la CP pueden inducir la "desaparición" de LPM residentes, lo que lleva a una disminución en su número, cuya magnitud se correlaciona con la severidad de la inflamación. La recuperación del repertorio original de LPM se da mediante la proliferación de los LPM residentes remanentes y el reemplazo por macrófagos derivados de monocitos inflamatorios (IMacs). Estos macrófagos generados tras inflamaciones leves coexisten a largo plazo con los LPM residentes remanentes, pero no adquieren un fenotipo de LPM residente, debido a la competencia con estos últimos y a alteraciones en el microambiente peritoneal. En contraste, inflamaciones severas pueden conducir a la eliminación total de los LPM residentes, los cuales son eventualmente reemplazados por IMacs que adquieren una identidad de LPM residente, aunque mantienen características funcionales y transcripcionales divergentes, determinadas por su origen, la inflamación peritoneal y el tiempo de residencia. Figura tomada y modificada de (103).

Por otro lado, los IMacs presentan una mayor capacidad proliferativa en comparación con los LPM residentes (135,146), lo que se ha vinculado a una mayor sensibilidad a M-CSF producido por las células mesoteliales (155). Además, al contrario que los LPM, los IMacs no producen CXCL13 (146), por lo que su ausencia durante la inflamación peritoneal afecta negativamente la acumulación de las células B1 (128).

1.4 El hígado y las células de Kupffer

El hígado desempeña funciones clave en el metabolismo, la detoxificación y la regulación de la respuesta inmune (156). Anatómicamente, como se ilustra en la Figura 1.4, el hígado está organizado en lobulillos, que constituyen unidades estructurales hexagonales repetidas a lo largo de todo el tejido. Cada lobulillo contiene en su centro una vena central, que desemboca en la vena hepática y se encarga de retornar la sangre desoxigenada al corazón. Alrededor de cada vena central se disponen seis tríadas portales. Cada tríada portal está formada por (i) una rama de la vena porta, que transporta sangre rica en nutrientes desde el intestino, el bazo y el estómago (aproximadamente el 75 % del flujo sanguíneo al hígado), (ii) una arteria hepática, que aporta sangre oxigenada desde el corazón (el 25 % restante), y (iii) un conducto biliar, recubierto por colangiocitos, un tipo de célula epitelial especializada. Toda la sangre que entra al hígado drena desde las tríadas portales hacia la vena central a través de los sinusoides hepáticos. Los sinusoides hepáticos son estructuras microvasculares dinámicas con fenestraciones, responsables del intercambio de nutrientes entre la sangre y el espacio perisinusoidal denominado espacio de Disse (156,157). Los sinusoides hepáticos se encuentran delimitados por células endoteliales especializadas, las células del endotelio sinusoidal hepático (LSEC por su sigla en inglés *liver sinusoidal endothelial cells*) (158).

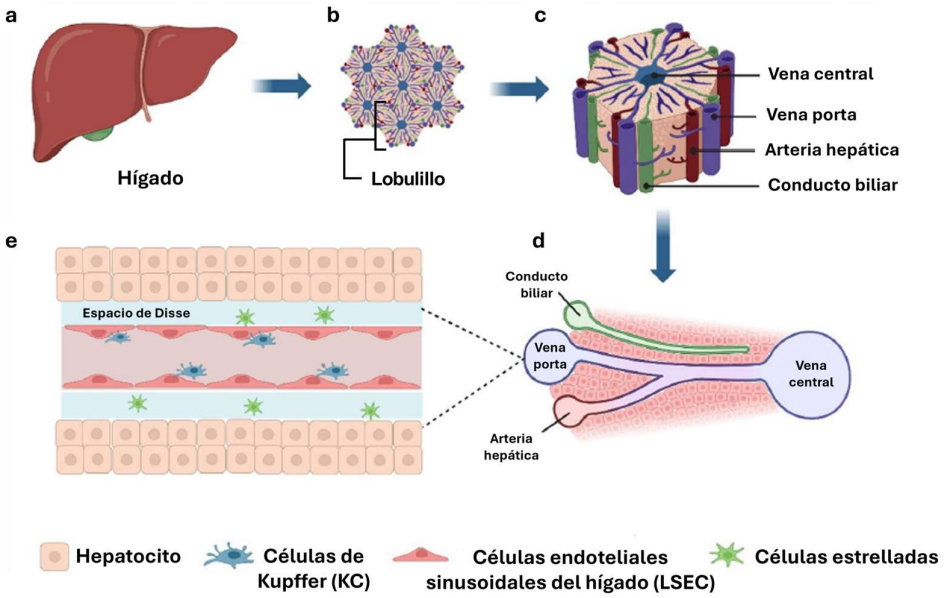


Figura 1.4. Esquema de la estructura del hígado. (a) Hígado. (b), (c) Imagen esquemática de los lobulillos hepáticos y su estructura interna. (d) Sección transversal del lobulillo hepático. (e) Sinusoides hepáticos, delimitados por las LSEC. Entre los hepatocitos y las LSEC, se encuentra el espacio de Disse, en el que se residen las células estrelladas. Dentro de los sinusoides hepáticos residen las KC. Figura extraída y modificada de (159).

Las células de Kupffer (KC), por su nombre en inglés *Kupffer cells*) son los principales macrófagos residentes del hígado y son la principal población de células no parenquimales (es decir, diferentes a los hepatocitos) allí presentes. Además representan la mayor población de macrófagos tisulares en el cuerpo (160). Las KC son células sésiles, expuestas a la luz de los sinusoides hepáticos, en íntimo contacto con las LSEC (161). Esta ubicación estratégica les permite captar rápidamente a los patógenos que ingresan desde la circulación portal o arterial, desempeñando así un papel clave en la respuesta inmune innata sistémica. Además, son responsables de eliminar partículas, glóbulos rojos dañados y células muertas que circulan en la sangre, lo que las convierte en las principales encargadas de las funciones de limpieza y defensa del organismo (162).

La mayoría de las KC se originan en el saco vitelino, se establecen en el hígado fetal durante la embriogénesis, y se mantienen a lo largo de la vida mediante proliferación local regulada principalmente por M-CSF (163–167). Sin embargo, ante procesos inflamatorios, estrés o daño hepático, se incrementa la proporción de KC derivadas de monocitos procedentes de la médula ósea, las cuales también pueden proliferar una vez establecidas en el hígado (168,169). Además, las KC

responden con proliferación a la IL-4, tanto ante su administración exógena *in vivo* (76), como en contextos de infección que inducen la producción de IL-4 en el hígado (77,170).

Las KC, en condiciones basales, muestran un fenotipo tolerogénico (171). Sin embargo, en situaciones de inflamación, como infecciones hepáticas, enfermedades autoinmunes o disfunciones metabólicas (por ejemplo, en el abuso de alcohol), pueden cambiar a un fenotipo M1 proinflamatorio (171,172).

1.5 CD40 y CD40L

CD40 es una proteína transmembrana tipo I, monomérica, de 48 KDa, perteneciente a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral a (TNF-α) (173). Se expresa en células B, DC, monocitos, plaquetas y macrófagos, así como en células no hematopoyéticas como miofibroblastos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales (174–176).

El ligando de CD40, conocido como CD40L o CD154, es una proteína transmembrana de tipo II, homotrimérica, perteneciente a la superfamilia de TNF, con un peso molecular variable entre 32 y 39 kDa debido a posibles modificaciones postraduccionales (173). Se ha descrito una forma soluble trimérica de CD40L que expresa actividades similares a la forma transmembrana (177,178). CD40L se expresa principalmente en células T $CD4^+$ activadas, así como en plaquetas; y, en condiciones inflamatorias, también se puede inducir en monocitos, células NKT, mastocitos y basófilos (179).

El principal receptor para CD40L es CD40. La unión de CD40 con su ligando CD40L induce la oligomerización de CD40 en la membrana (Figura 1.5) e impulsa el reclutamiento de proteínas adaptadoras conocidas como TRAF (factores asociados al receptor del TNF) al dominio citoplasmático de CD40 (180). Estas proteínas activan diversas rutas de señalización, incluyendo las vías canónica y no canónica de NF-κB, MAPK, PI3K y PLCγ (180). Además, se ha demostrado que la señalización puede ocurrir independientemente de las proteínas TRAF, a través de la unión directa de Jak3 al dominio citoplasmático de CD40, activando la fosforilación del factor de transcripción STAT5 (181,182).

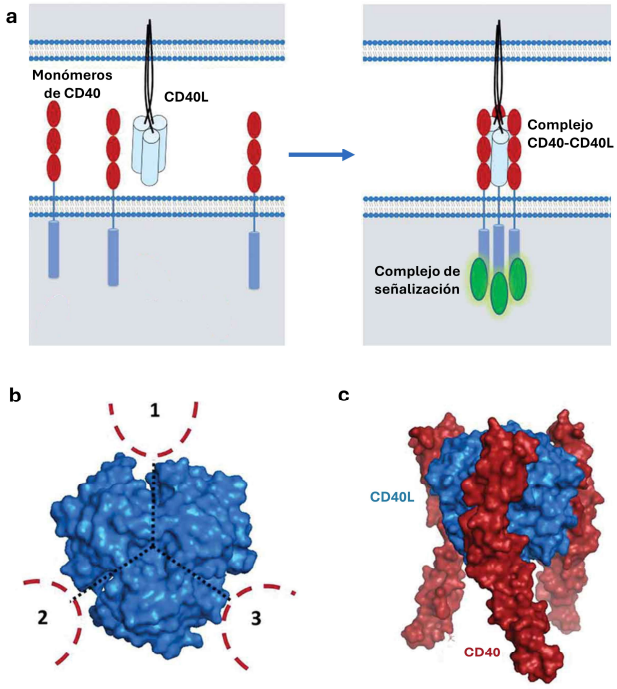


Figura 1.5. Representación de la interacción CD40-CD40L. (a) La unión de CD40 a CD40L induce la oligomerización de CD40 y conduce a la agrupación proteínas implicadas en la transducción de señales intracelulares. (b) Sitios de unión a CD40 del trímero de CD40L. (c) Estructura tridimensional del complejo CD40-CD40L. Figura extraída y modificada de (183).

La interacción CD40-CD40L cumple un rol central en la inmunología, y sus funciones más estudiadas se relacionan con la unión entre CD40, expresado en células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés *antigen presenting cells*) y CD40L presente en la superficie de células T $CD4^+$ activadas en un contexto específico de antígeno. En este escenario, la señalización a través de CD40 en las DC promueve su maduración y la adquisición de propiedades necesarias para activar y diferenciar eficazmente a las células Th1, entre ellas la producción de IL-12, (184). En las células B, la interacción de CD40 con células T foliculares colaboradoras promueve la formación de centros germinales, el cambio de clase de inmunoglobulinas, la hipermutación somática para aumentar la afinidad por el antígeno, y la generación de células plasmáticas de larga vida y células B de memoria (185). En monocitos y macrófagos, la ligación de CD40 induce eficientemente su activación clásica, promoviendo la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1α e IL-1β (186), TNF-α (187,188), IL-6 (188–190) e IL-12 (191,192), así como quimioquinas como CXCL8 (188), CCL2, CCL3, CCL4 y CCL5 (193). Esta señalización también potencia las funciones efectoras de los

macrófagos, como la expresión y secreción de metaloproteinasas de matriz (MMP) (194–196) y la producción de NO (187,197). Además, incrementa la expresión de moléculas del MHCII y de coestimuladoras como CD80, CD86 y el propio CD40 (188).

Aunque la señalización directa de CD40L a través de CD40 ha sido ampliamente estudiada, poco se sabe sobre su señalización reversa, es decir, aquella que actúa directamente sobre la célula T $CD4^+$ que expresa CD40L. Algunos estudios han propuesto que CD40L puede activar vías intracelulares en células T $CD4^+$ a través de distintas isoformas de PKC y JNK (198,199). Más recientemente, se demostró que esta señalización, independiente de la interacción con APC, regula de forma intrínseca la supervivencia, proliferación y polarización de las células T $CD4^+$ hacia el perfil Th1 mediante RACK1 y STAT1 (200).

Si bien como se dijo el receptor más ampliamente caracterizado para CD40L es CD40, se han identificado tres receptores alternativos, que pertenecen a la familia de las integrinas. Uno de ellos es la glicoproteína plaquetaria $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), también conocida como receptor de fibrinógeno y del factor von Willebrand (201,202). Otro receptor alternativo es la integrina $\alpha_5\beta_1$ (CD49e/CD29), expresada en varios tipos de células del sistema inmune y células mesenquimales, que se une a MMP, y estimula la angiogénesis (203–205). Por último está Mac-1, también conocido como receptor del complemento 3 (CR3, o CD11b/CD18 o $\alpha_M\beta_2$), que es expresado principalmente por monocitos, macrófagos, neutrófilos, y células NK (206). Mac-1 se une al fragmento de complemento iC3b, mediando la fagocitosis de blancos opsonizados, y se adhiere a ICAM-1 facilitando la adhesión a endotelio y otras células (207)

1.5.1 Regulación y presentaciones de CD40L

Dadas las funciones críticas que tiene la señalización a través de CD40, la expresión de CD40L en la superficie de las células T $CD4^+$ está estrictamente regulada (173). Tras la activación a través del receptor T (TCR) por moléculas de MHCII cargadas con péptidos y expresadas en APC, las células T $CD4^+$ vírgenes (V) inician la síntesis de CD40L, cuya expresión en la superficie celular es detectable a las 2 horas, alcanza un pico alrededor de las 6 horas y disminuye notablemente hacia las 24 horas posteriores a la estimulación (208). Por otro lado, las células T $CD4^+$ que previamente han experimentado estimulación antigénica contienen abundante CD40L intracelular, que en respuesta a una re-estimulación por el TCR

es translocado a la superficie celular (209,210). Este mecanismo actúa como una reserva funcional que permite una respuesta inmediata ante un segundo encuentro con el antígeno. Se ha observado que, en células T $CD4^+$ efectoras aisladas de amígdalas humanas, el CD40L intracelular puede movilizarse a la membrana en tan solo 5 a 15 minutos luego de una estimulación policlonal con PMA/ionomicina o con un anticuerpo anti CD3 (209). Además, la estimulación por TCR en células T efectoras, potencia la transcripción de CD40L al igual que en las células T $CD4^+$ V, para rellenar las reservas intracelulares de esta proteína (211,212).

Por otro lado, el CD40L puede influir en células que expresan CD40 aun en ausencia de una interacción celular específica, tal como lo evidencian los efectos biológicos de la forma soluble de CD40L, de anticuerpos agonistas de CD40 y de células con expresión forzada de CD40L (186,189,212–218).

Se ha descrito que las células T $CD4^+$ V expresan constitutivamente bajos niveles del ARNm y la proteína CD40L, y que la proteína se presenta mayoritariamente en la superficie celular (210,219,220). La información disponible sobre tal CD40L constitutivo es muy limitada, pero algunos reportes sugieren que es funcional, modulando la activación de monocitos *in vitro* (221), y promoviendo, indirectamente, la supervivencia de células B autorreactivas en un modelo de autoinmunidad (220).

La expresión de CD40L en la superficie de las células T $CD4^+$ está sometida a una fuerte regulación negativa mediada por las células $CD40^+$, que inducen la endocitosis y degradación lisosomal del CD40L, y/o su desprendimiento de la membrana plasmática (*shedding*) (211,215). Esta regulación negativa afecta tanto al CD40L externalizado tras la activación del TCR como al CD40L constitutivo, y es ejercida por todas las células examinadas que expresan CD40, estén o no en interacción específica con la célula T $CD4^+$ (210–212,215,220). Los mecanismos de regulación negativa dificultan la detección de CD40L en la superficie celular mediante metodologías convencionales como la citometría de flujo. Sin embargo, estas limitaciones pueden ser superadas mediante el uso de células T $CD4^+$ purificadas (220,221), de un anticuerpo bloqueante contra CD40 (222,223) o de animales deficientes en CD40 (220).

1.6 CD40-CD40L en respuestas inmunes de tipo 2

Si bien la interacción CD40-CD40L cumple un papel central en la inmunidad de tipo 1, su función en las respuestas de tipo 2 no está completamente esclarecida (224). Contrariamente a los contextos en los que hay agonistas de TLR, en los que el CD40 se induce fuertemente en las DC, esto no ocurre durante infecciones por helmintos, en las que la expresión de CD40 suele mantenerse baja (225–229). Además, la exposición *in vitro* de DC a diversos productos derivados de helmintos suele inducir poca o ninguna regulación positiva de CD40, e incluso puede antagonizar la regulación de CD40 promovida por agonistas de TLR (225,230–233). Estos hallazgos sugieren que la señalización a través de CD40–CD40L no solo sería prescindible para inducir respuestas Th2, sino que incluso podrían oponerse a ella. En modelos *in vivo*, los ratones deficientes en CD40 o CD40L desarrollan respuestas Th1 débiles frente a patógenos que inducen respuestas con sesgo de tipo 1, como *Leishmania*, y en su lugar generan respuestas de tipo 2 (234). Además, en sistemas de inmunización con preparados antigénicos o alergénicos con capacidad de inducir respuestas Th2, el uso de anticuerpos agonistas de CD40 desvía la respuesta hacia un perfil Th1 (235–237).

Sin embargo, en oposición a lo antes expuesto, en experimentos de inmunización o infección *in vivo*, la deficiencia genética de CD40L o CD40, o el bloqueo de CD40L mediante el uso de anticuerpos, suele tener un impacto negativo marcado sobre la inducción de respuestas Th2. Este impacto se manifiesta de forma más marcada y consistente en la respuesta humoral (238–244), probablemente debido a la necesidad de la colaboración de las células T $CD4^+$ a través de CD40L para la proliferación de células B y, en particular, para el cambio de clase de anticuerpos (245–248). La producción de citoquinas por células T tras una re-estimulación antigénica es generalmente deficiente en animales que fueron previamente expuestos a la infección en ausencia de CD40 o CD40L en distintos modelos de infección por helmintos (238,241,243,249). Recientemente se ha demostrado que, en un subtipo específico de DC convencionales (cDC2), fundamental para la inducción de respuestas Th2 ($CD301b^+$, es decir $MGL2^+$), la activación de CD40 promueve la producción de IL-2, lo que incrementa la expresión de CD25 en células T $CD4^+$ y favorece su polarización hacia el perfil Th2, mientras restringe su diferenciación hacia células T foliculares colaboradoras (250). Esto parece explicar la necesidad de la señalización a través de CD40 para la inducción de la respuesta Th2, sugiriendo que las cDC2 $CD301b^+$ son particularmente eficientes en las respuestas contra parásitos helmintos, y que responden de manera selectiva al CD40L producido durante esa interacción, a diferencia de otros tipos de DC (250).

La IL-21, producida por las células T foliculares colaboradoras, es la principal co-señal junto con CD40L para inducir la proliferación de células B en los centros germinales (251–253). Sin embargo, diversos estudios han consolidado el concepto de que las células B proliferan en respuesta a la IL-4 cuando reciben simultáneamente la señal de CD40L proveniente de células T $CD4^+$ (216,217,254,255). Es cuestionable por qué una citoquina típica del perfil tipo 2 induciría la proliferación de células B junto con una señal (CD40L) que no está específicamente asociada a respuestas de tipo 2. Esto podría sugerir la existencia de una colaboración, desarrollada evolutivamente, entre IL-4 y CD40L para amplificar la respuesta de las células B a través de la proliferación de estas últimas en ciertos contextos. No está claro cuánto podría influir este mecanismo en contextos de interacción específica, donde la IL-4 podría no ser necesaria para la proliferación de las células B (256–258). Sin embargo, en contextos fuera de la interacción específica, el uso de anticuerpos agonistas de CD40, o de CD40L soluble recombinante, requiere la presencia de IL-4 para inducir una proliferación significativa de células B, acompañada de una producción policlonal de IgE independiente de células T (216–218,254,255,259,260). Por lo tanto, la respuesta de las células B a la estimulación "artificial" combinada de CD40L e IL-4 podría reflejar situaciones *in vivo* en las que las células B son estimuladas de manera no específica en sitios de infección por patógenos que inducen respuestas de tipo 2, como los helmintos (224).

1.6.1 Papel de CD40-CD40L sobre los macrófagos en respuestas de tipo 2

La información disponible sobre el impacto de la activación de CD40 en macrófagos dentro de contextos de tipo 2 es muy limitada. Se ha reportado que los macrófagos M(IL-4) presentan niveles bajos de CD40 (261), pero no existen datos acerca de cómo su activación influye sobre las respuestas funcionales de estos macrófagos frente a infecciones por helmintos o a la IL-4, incluida la proliferación. Recientemente, en un modelo tumoral, se observó que la activación exógena de CD40, utilizando un anticuerpo agonista, inhibe la expresión de marcadores M(IL-4) característicos en TAMs *in vivo* (262). No obstante, el resultado de la señalización a través de CD40 puede variar considerablemente según la intensidad del estímulo (263).

1.7 Hipótesis de trabajo

En base a lo expuesto anteriormente la hipótesis inicial de esta tesis fue que distintos tipos de CD40L podían afectar de manera diferente las respuestas de los macrófagos en contextos de tipo 2, dependiendo probablemente de su forma de presentación o concentración, así como del contexto en el que ocurre la interacción, ya sea durante la presentación de antígeno o fuera de ella. En base a esta hipótesis, se estudió el impacto sobre las respuestas de los macrófagos a IL-4 y/o en contextos de tipo 2 del CD40L endógeno disponible en condiciones basales, de agonistas solubles de CD40, y del CD40L presente en un contexto de presentación antigénica convencional.

Es necesario precisar el significado de CD40L disponible en condiciones basales. Este CD40L incluye en primer lugar al CD40L constitutivamente expresado por células T $CD4^+$ V (210). Podría asumirse que, justamente por ser expresado por células T $CD4^+$ definidas como V, el CD40L constitutivo actuaría por fuera de las interacciones específicas de antígeno. Sin embargo, se ha demostrado que las células T $CD4^+$ V interactúan en forma específica de antígeno con DC que presentan péptidos propios, sin alcanzar el umbral de activación y por lo tanto sin perder su fenotipo V (264,265). De forma análoga, este tipo de interacciones sub-umbral también podría tener lugar entre células T $CD4^+$ V y macrófagos, es decir que, conceptualmente, los macrófagos podrían detectar CD40L constitutivo tanto fuera como dentro del contexto de interacciones específicas de antígeno. Por otro lado, aún en condiciones basales, es decir en ausencia de intervenciones del tipo inmunización o infección experimental, es posible que haya interacciones celulares específicas de antígeno entre macrófagos y células T $CD4^+$ que han tenido experiencia antigénica previa y por lo tanto generado reservas de CD40L; en tales casos, los antígenos podrían provenir de patógenos no excluidos por las condiciones de cría de los animales, o potencialmente de la microbiota o la dieta (en contextos de respuestas anormales). Por lo tanto, a nivel de concepto, el CD40L disponible en condiciones basales puede incluir CD40L constitutivo, detectado fuera o dentro del contexto de interacciones celulares específicas de antígeno, así como CD40L no constitutivo, inducido por antígeno.

Para abordar las hipótesis planteadas, se utilizaron distintos sistemas *in vitro* e *in vivo*, analizándose el CD40L endógeno presente en condiciones basales en la CP y estudiándose el efecto de su bloqueo o de la ausencia de señalización a través de CD40 sobre las respuestas de los macrófagos en presencia de IL-4. De manera secundaria, se analizó si las KC son sensibles al CD40L endógeno, considerando que están expuestas al CD40L constitutivo expresado por células T $CD4^+$ V circulantes. Además, se evaluó el impacto de agonistas solubles de CD40 sobre los

macrófagos estimulados con IL-4. Finalmente, se empleó el modelo de infección helmíntica por *H. polygyrus* para estudiar el rol del CD40L inducido por la presentación de antígenos en la CP y su efecto sobre las respuestas de los macrófagos peritoneales y las KC frente a la IL-4/IL-13 producidas durante la infección.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es caracterizar el papel del CD40L en la proliferación y polarización M(IL-4) de los macrófagos en contextos de respuesta de tipo 2.

2.2 Objetivos específicos

1) Evaluar la expresión de CD40L en células de la CP en condiciones basales.
2) Evaluar la posible interacción entre CD40L expresado por células T $CD4^+$ y CD40 expresado por macrófagos *in vivo* en la CP en condiciones basales.
3) Estudiar el impacto del CD40L endógeno sobre las respuestas de los macrófagos peritoneales inducidas por la IL-4, *in vitro* e *in vivo*, en condiciones basales y en contexto de inflamación estéril.
4) Estudiar el efecto de agonistas exógenos de CD40 sobre las respuestas de los macrófagos peritoneales inducidas por la IL-4.
5) Evaluar el impacto del CD40L endógeno sobre las respuestas de los macrófagos peritoneales durante la infección por *Heligmosomoides polygyrus*.
6) Evaluar el impacto del CD40L endógeno sobre la proliferación de las KC en respuesta *in vivo* a la administración de IL-4 exógena y durante la infección por *H. polygyrus*.
7) Explorar posibles co-estímulos y condiciones de cultivo que permitan la proliferación de macrófagos peritoneales en respuesta a IL-4 *in vitro*.

3 Materiales y métodos

3.1 Animales de experimentación

Los ratones de tipo silvestre C57BL/6 (WT, por sus siglas en inglés *wild type*), hembras, utilizados en los experimentos que no incluyeron animales de otro genotipo, fueron obtenidos de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Higiene (IH) a partir de las 6-7 semanas de edad.

Los animales genéticamente deficientes en CD40 (B6.129P2-Cd40tm1Kik/J; CD40 KO), fueron originalmente adquiridos en *Jackson Laboratories*. La colonia fue amplificada y mantenida en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina. A partir de las 4–5 semanas de edad, los ratones CD40 KO, así como sus controles WT, también provenientes de la URBE, fueron transferidos al Bioterio del IH, y mantenidos en cajas donde cohabitaron individuos de ambos genotipos durante al menos tres semanas, con el objetivo de equilibrar la microbiota. Para permitir una adecuada amplificación de la colonia, en los experimentos que incluyeron animales CD40 KO se utilizaron mayoritariamente ratones machos, sin observarse diferencias entre machos y hembras, y siempre se usaron ratones de igual sexo para ambos genotipos.

Durante su permanencia en el Bioterio del IH, los animales tuvieron acceso libre a alimento y agua. Los experimentos se llevaron a cabo con individuos de entre 8 y 14 semanas de edad. Todos los procedimientos fueron aprobados por la CHEA con los protocolos de Facultad de Química 101900-000491-18, 101900-000520-18, 101900-001483-19, y Facultad de Medicina 070151-000031-22, 070151-000039-22, 070151-000040-22, 070151-000019-24, 070151-000006-24 y 070151-000030-24. En todos los casos, el sacrificio de los animales fue realizado por inhalación de isofluorano.

Los experimentos que requirieron ratones SCID (CB-17/Icr-*Prkdc*$^{scid/scid}$/Rj), así como algunos experimentos *in vitro* —incluidos los cultivos de las células de la cavidad peritoneal sin células T CD4^{+}, cultivos de macrófagos y células T CD4^{+} purificadas por *cell sorting*, y cultivos en condiciones de hipoxia— correspondientes a la Sección 1 del capítulo de Resultados, los experimentos de infección con *H. polygyrus* de la Sección 6, y una réplica de los experimentos de bloqueo *in vivo* de CD40L de la Sección 2, se realizaron en la Universidad de Manchester, Reino Unido. Para estos estudios, se utilizaron ratones SCID machos o ratones C57BL/6 WT hembras provenientes de *Charles River Laboratories*, los cuales fueron mantenidos en el bioterio de la universidad. Todas las intervenciones con animales vivos, así

como los procedimientos de eutanasia, fueron realizados por personal autorizado (técnicos y/o postdoctorales) del laboratorio de Judith E. Allen.

3.2 Procesamiento de las muestras biológicas colectadas

Los procedimientos que requirieron muestras biológicas con el objetivo de obtener células destinadas a cultivo se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar horizontal, empleando materiales y soluciones estériles. En cambio, cuando el material biológico se utilizó para mediciones *ex vivo* inmediatas, los procedimientos se realizaron fuera de la cabina, utilizando soluciones frescas y limpias, aunque no necesariamente estériles.

3.2.1 Obtención de células de la CP

Una vez que los animales fueron sometidos a eutanasia, se realizó un lavado peritoneal (con jeringa de 5 mL y aguja 24G) con 1 mL de RPMI (Sigma, R6504 o Biological Industries, 11-100-1N) frío suplementado con 0.2 % v/v de suero fetal bovino (SFB, ProBioMont, Uruguay) inactivado por calor, seguido de dos lavados adicionales de 5 mL cada uno, utilizando la misma solución. Tanto el primer lavado como los dos siguientes se centrifugaron, y el sobrenadante del primer mililitro se conservó (cuando fue necesario) para la cuantificación de mediadores solubles mediante ELISA. Se unificaron las células recuperadas de todos los lavados para cada ratón y se determinaron los números absolutos por conteo automático utilizando el contador *Nexcelom Cellometer K2* o *ImmunoSpot CTL* con tinción con naranja de acridina/ioduro de propidio (AOPI, por sus siglas en inglés), para determinar viabilidad celular. Para los experimentos *in vitro* que requerían pocos individuos se realizó el conteo manual utilizando cámara de Neubauer y tinción con azul tripán 0.1% m/v para determinar la viabilidad celular. Se mantuvieron las células en frío hasta su procesamiento por citometría de flujo o siembra en placas de cultivo según lo requiriera el experimento.

3.2.1.1 Purificación de macrófagos de la CP

Se obtuvieron las células de la CP de ratones vírgenes WT o CD40 KO según lo descrito en la sección 3.2.1. Posteriormente, los macrófagos fueron purificados por selección negativa, utilizando perlas magnéticas conjugadas a estreptavidina y anticuerpos biotinilados dirigidos contra distintos tipos celulares de la CP, excluyendo a los macrófagos. Para ello, 1 x 10^7 células totales de la CP se re-suspendieron en 1 mL de *buffer* de aislamiento (PBS suplementado con BSA 0.1 % m/v y EDTA 2mM) y se agregó 2.5 µL del anticuerpo anti CD16/CD32 (BD Pharmigen, 553142) para el bloqueo de receptores Fc, seguido de una mezcla de anticuerpos biotinilados conteniendo anti CD19 (5 µg), Siglec-F (5 µg), CD3 (20 µg), Gr1 (5 µg), TCRβ (20 µg) y Ly-6C (10 µg) (Biolegend 115503, 155512, 100243, 108403, 109203, 128003). Las células se incubaron en hielo durante 10 minutos y se lavó el exceso de anticuerpos por centrifugación. Se re-suspendieron las células nuevamente en 1 mL de *buffer* de aislamiento y se incubaron con 100 µL de perlas *Dynabeads biotin binder* (Thermo Fisher, 110.47) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las perlas magnéticas unidas a las células no deseadas a través de los anticuerpos biotinilados fueron separadas utilizando un soporte de tubos imantado, y se recuperó la fracción de macrófagos purificados siguiendo las indicaciones del fabricante. La eficiencia del proceso de purificación fue verificada mediante citometría de flujo, obteniéndose un porcentaje de macrófagos totales (LPM y SPM) mayor al 90 % para WT y para CD40 KO (Figura 3.1). El rendimiento de purificación, calculado como $\frac{Cantidad\ de\ células\ después\ de\ purificar}{Cantidad\ de\ células\ antes\ de\ purificar} \times 100$, fue cercano al 40 % para los LPM y 60 % para los SPM, independientemente del genotipo. Cabe señalar que la población denominada SPM incluye a DC CD11b$^+$, ya que los anticuerpos utilizados no permiten la exclusión de estas células.

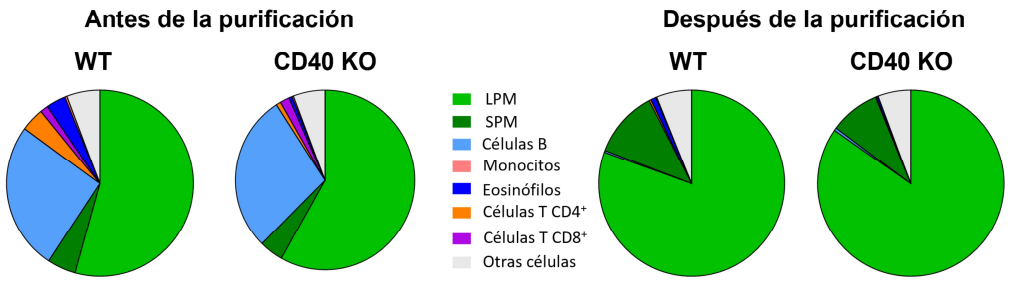


Figura 3.1. Purificación de macrófagos a partir de células de la CP en condiciones basales. Se muestra la composición basal de la CP en ratones WT y CD40 KO antes y después de la purificación de macrófagos para un experimento representativo.

Para ciertos experimentos, se realizó similar procedimiento de purificación, pero con el objetivo de eliminar exclusivamente a las células B. Para ello, se incluyó únicamente el anticuerpo biotinilado anti CD19, y se siguieron los mismos pasos del protocolo previamente descrito.

Todos los procedimientos fueron realizados dentro de una cabina de flujo laminar horizontal para conservar la esterilidad de las muestras.

3.2.2 Obtención de células del bazo

Una vez sacrificados los animales, se colectaron los bazos y se disgregaron entre dos mallas de serigrafía (poro de 80 µm) mediante raspado con pinzas, en placas de petri con 5 mL de RPMI en frío. Obtenida la suspensión celular, se centrifugaron las muestras a 350 g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante, y se lisaron los glóbulos rojos con 3 mL de NH_4Cl 0.168 M por bazo durante 2 minutos. Inmediatamente se agregó 30 mL de RPMI frío, se centrifugaron las muestras a 350 g por 5 minutos y se re-suspendieron en 10 mL de RPMI para proceder a su conteo. El número de células obtenidas se determinó como se indicó previamente.

3.2.2.1 Purificación de células T $CD4^+$ del bazo

Se obtuvieron las células totales del bazo de un ratón CD40 KO como se describió en la sección 3.2.2. Se purificaron las células T $CD4^+$ utilizando el *kit Dynabeads® Untouched™ Mouse CD4 Cells* (Thermo Fisher, 11415D). Este *kit* contiene perlas recubiertas con un anticuerpo policlonal secundario que se une a las IgG de rata, y una mezcla de anticuerpos IgG de rata que se unen a células T $CD8^+$, células B, células NK, monocitos, macrófagos, DC, eritrocitos y granulocitos de ratón. El procedimiento se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante. Se verificó mediante citometría de flujo la composición de las fracciones antes y después de purificar (Figura 3.2) obteniéndose una muestra enriquecida en células T $CD4^+$ con un 90 % de pureza y un rendimiento del 55 %.

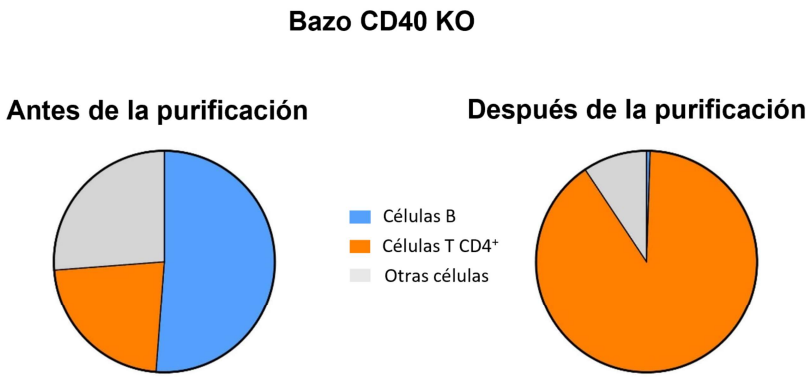


Figura 3.2. Purificación de células T CD4⁺ a partir del bazo de un ratón CD40 KO. Se muestra la composición basal del bazo de un ratón CD40 KO antes y después de la purificación de células T CD4⁺ para un experimento representativo.

3.2.3 Obtención de células de los ganglios mesentéricos

Una vez sacrificados los ratones, se colectaron los ganglios mesentéricos y se mantuvieron en RPMI frío hasta su procesamiento. Los ganglios de cada ratón se procesaron juntos, disgregándolos entre mallas de serigrafia, de forma idéntica a la descrita para los bazos (3.2.2). Luego de liberar su contenido celular, este se recuperó y se centrifugó a 350 g durante 5 minutos. Posteriormente las células se re-suspendieron en 2 mL de RPMI para proceder a su conteo.

3.2.4 Procesamiento del hígado para la obtención de la fracción no parenquimal hepática

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se perfundió el hígado con 10 mL de PBS frío, inyectado a través de la vena cava inferior (con jeringa de 10 mL y aguja 24G) y permitiendo su drenaje mediante una pequeña incisión realizada en la vena porta, con la finalidad de remover toda la sangre de los sinusoides hepáticos. A continuación, se colectó el lóbulo izquierdo del hígado y se mantuvieron las muestras en RPMI en frio hasta su procesamiento. Se masaron los hígados secos y se disgregaron mecánicamente mediante cortes con hojas de afeitar en placas de petri sobre hielo, hasta obtener una pasta homogénea. El material disgregado fue transferido a tubos de 50 mL y sometido a digestión enzimática con 5 mL de una solución con 0.4 U/mL de Liberasa (Roche, 05401020001) y 80 U/mL de ADNasa I (Sigma, D5025) en RPMI, por cada 2.5 g de tejido. La digestión se realizó durante 25 minutos a 37 °C, con agitación constante

a 250 rpm y agitación manual cada 5 minutos para favorecer la disgregación del tejido. A continuación, se detuvo la digestión con la adición de 25 mL de RPMI frio. Luego, la suspensión celular se filtró con filtros para células de 100 µm y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con 15 mL de RPMI frío y se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones. Se lisaron los glóbulos rojos por re-suspensión de las células en 1 mL de *buffer* de lisis (Sigma, R7757) durante 2 minutos en hielo. Inmediatamente, se detuvo la lisis por el agregado de 2 mL de *buffer* FC (0.5 % BSA m/v, 2 mM EDTA en PBS). Finalmente se centrifugaron las células a 300 g durante 5 minutos y se re-suspendieron en 3 mL de *buffer* FC, tras lo cual se filtraron con filtros de células de 40 µm. Se contaron las células como se describió previamente. Durante todo el procesamiento (excepto en la digestión enzimática) las células fueron mantenidas en hielo.

3.3 Experimentos *in vitro*

3.3.1 Cultivo y estimulación de células totales de la CP en condiciones basales

Se obtuvieron células de la CP a partir de entre 3 y 6 ratones (del genotipo correspondiente), según la cantidad requerida para cada experimento, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.1. Durante todo el proceso, se utilizó medio RPMI estéril 0.2 % v/v SFB suplementado con antibiótico/antimicótico (estreptomicina, penicilina y anfotericina B; Capricorn, AAS-B). Las muestras de individuos independientes se unificaron para su estudio como una única muestra representativa. Una vez realizado el conteo celular de la muestra unificada, se sembraron 3×10^5 células por pozo en placas de cultivo de 48 pocillos en 250 µL de RPMI suplementado con 10 % SFB (medio completo). Las células sembradas se mantuvieron durante toda la noche en incubador a 37°C con 5 % v/v de CO_2 previo a ser estimuladas. Transcurrido este tiempo, con el fin de eliminar parte de las células no adheridas y renovar el medio de cultivo, se retiraron 150 µL de los pozos y se sustituyeron por medio completo, contemplando el o los estímulos correspondientes, hasta alcanzar un volumen final de 280 µL. Se estimularon las células según correspondía con 20 µL de 80 ng/mL de IL-4 (PeproTech, 214-14), 1 µg/mL de sCD40L (PeproTech, 315-15), 40 ng/mL de M-CSF (PeproTech, 315-02), 10 µg/mL del anticuerpo bloqueante de CD40L (MR1) (Biolegend, 106518) o su control (Biolegend, 400960) durante 48 horas en las mismas condiciones de incubación. Cuando se realizaron medidas de proliferación, 24 horas previo a la finalización del experimento, se adicionó al cultivo 10 µM de BrdU (Applichem, A2139,0005) como análogo de base incorporable al ADN y detectable posteriormente por citometría de

flujo en células permeabilizadas. Una vez finalizado el experimento se colectaron los sobrenadantes de los pocillos de cultivo para la cuantificación de mediadores solubles por ELISA cuando fuera necesario. Por otro lado, las células adheridas se cosecharon por despegado mecánico mediante pipeteo, utilizando *Cellstripper* (Corning, 25-056-CI) o una solución de PBS con EDTA 3 mM y glucosa 0.1 % m/v. Las células recolectadas se transfirieron a placas de 96 pozos con fondo en V para su posterior tinción por citometría de flujo.

En los experimentos *in vitro* con células de la CP no se discriminó entre LPM y SPM, ya que los LPM cultivados en ausencia de ácido retinoico sufren una desdiferenciación parcial (127,143), de modo que ya no se pueden distinguir de los SPM en función de F4/80 y MHCII. En base a ello, para la mayoría de estos experimentos, excepto que se indique lo contrario, se utilizó la estrategia de definición celular que se observa en la Figura 3.3 para definir macrófagos totales y células B.

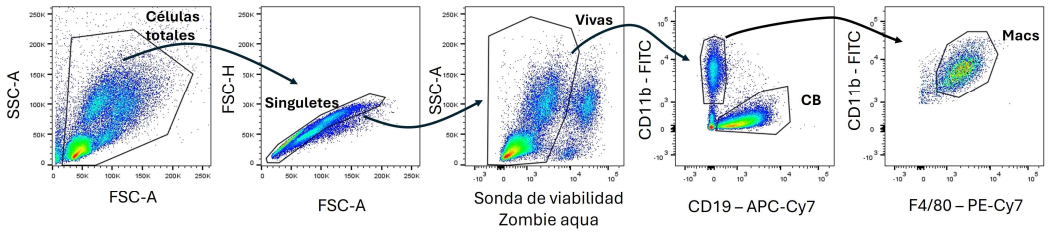


Figura 3.3. Estrategia de definición celular utilizada para la detección macrófagos y células B en los experimentos de CP *in vitro*. Se muestra la estrategia de definición celular utilizada para detectar células B (CB) y macrófagos totales (Macs) de la CP en cultivo por citometría de flujo utilizando un FACSCanto II. Los paneles de anticuerpos utilizados para la definición de las células variaron según la disponibilidad de los anticuerpos conjugados a distintos fluorocromos. La totalidad de los anticuerpos usados se describen en la Tabla 3.2.

3.3.2 Cultivo y estimulación de células totales de la CP en condiciones inflamatorias

Se inyectaron ratones WT vía i.p. con 800 µL de medio tioglicolato 4 % m/v (Sigma, B2551). Luego de 72 horas se obtuvieron las células de la CP como se describió en la sección 3.2.1 y las células se cultivaron como se detalló en la sección 3.3.1. Para la detección de los macrófagos inflamatorios (IMacs) se utilizó la estrategia de definición celular descrita en la Figura 3.3, con la salvedad de que los macrófagos

inflamatorios expresan niveles de F4/80 más bajos que los macrófagos en condiciones basales.

3.3.3 Cultivos de células de la CP sin células T $CD4^+$

Se obtuvieron células de la CP de 3 ratones WT, como se describe en la sección 3.2.1, y se unificaron para ser procesadas como una sola muestra representativa. A continuación, se procedió a la eliminación de las células T utilizando perlas magnéticas unidas a estreptavidina y anticuerpos biotinilados que reconocen células T de ratón. Se incubaron 1 x 10^7 células con los anticuerpos biotinilados anti CD3, CD4, CD8 y TCRγδ (Biolegend, 100243, 100403 100703, 118103) en dilución 1/100, en 100 µL de *buffer* de lavado (PBS con 2 % v/v SFB y EDTA 2 mM) a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron las células con *buffer* de lavado y se incubaron con 100 µL de las perlas *MojoSort™ Streptavidin Nanobeads* (Biolegend, 480016) a 4°C durante 15 minutos. Se realizó la separación de las células T unidas a las perlas magnéticas a través de los anticuerpos biotinilados del resto de las células, utilizando un soporte para tubos imantado y siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se evaluó mediante citometría de flujo, la presencia de células T $CD4^+$ en la fracción sin células T (PEC – T, PEC de la sigla en inglés, *peritoneal exudate cells*), así como en la enriquecida en células T (T) en comparación con la mezcla inicial (PEC total). Se obtuvo una eficiencia de la eliminación de células T $CD4^+$ calculada como:

$$1 - \left(\frac{\%\ CD4^+\ en\ PEC - C^+}{\%\ CD^+\ en\ PEC\ total}\right) \times 100 \text{ del } 98\%.$$

Una vez obtenidas las fracciones con el nivel de pureza deseado, se cultivaron 3 x 10^5 células de PEC total, 2.55 x 10^5 células de PEC - T, y la misma cantidad de la última fracción con adición de 4.5 x 10^5 células T (PEC - T + T) en pozos de placas de 48 pocillos en medio completo. Las células se estimularon con 80 ng/mL de IL-4 por 48 horas y posteriormente se cosecharon las muestras como se describió en la sección 3.3.1.

3.3.4 Cultivos de macrófagos y células T $CD4^+$ de la CP purificados por *cell sorting*

Se obtuvieron células de la CP de 12 ratones WT, como se describe en la sección 3.2.1, y se unificaron para ser procesadas como una única muestra. Se realizó la separación simultánea en dos vías para macrófagos y células T $CD4^+$ utilizando un

separador de células FACSAria™ Fusion. Para ello, se partió de 4 x 10^7 células totales de la CP en 500 µL de *buffer* FC, a las que se adicionaron 2.5 µL del anticuerpo anti CD16/CD32 para el bloqueo de receptores Fc, incubando la suspensión en hielo durante 10 minutos. A continuación, se agregó a la suspensión celular una mezcla de anticuerpos (Tabla 3.1) necesarios para el reconocimiento de los macrófagos y las células T $CD4^+$ de la CP por citometría de flujo, y se incubó en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se lavó el exceso de anticuerpos con *buffer* FC y se re-suspendieron las células en 2.5 mL de medio completo. Se filtró la muestra a través de filtros de células de 35 µm y se procedió a la separación celular. Para la separación celular se utilizó una boquilla de 85 µm y el procedimiento fue realizado por el técnico especializado en citometría de flujo de la *Flow Cytometry Core Facility* de la Universidad de Manchester, UK. Las células separadas se colectaron en tubos pre-recubiertos con SFB y 2 mL de medio completo. Al final de procedimiento se realizó la verificación de pureza, encontrándose que las fracciones recuperadas de macrófagos y células T $CD4^+$ presentaron ambas purezas mayores al 97%.

Tabla 3.1. Listado de anticuerpos utilizados para la purificación de macrófagos y células T $CD4^+$ mediante *cell sorting*. Se detallan los anticuerpos utilizados para el reconocimiento de células de la CP en un FACSAria™ Fusion. Dado el interés en detectar únicamente macrófagos y células T $CD4^+$, se realizó un "*dump gate*" para excluir las células B, eosinófilos y neutrófilos utilizando un solo detector (BV421).

Anticuerpo	Dilución final	Clon	Proveedor	# catálogo
PE-Cy7 anti mouse F4/80	1/200	BM8	Biolegend	123114
AF700 anti mouse I-A/I-E (MHCII)	1/800	M5/114.15.2	Biolegend	107622
APC-Cy7 anti mouse CD3	1/200	17A2	Biolegend	100222
BV421 anti mouse CD19	1/200	6D5	Biolegend	115538
BV421 anti mouse CD170 (Siglec-F)	1/200	S17007L	Biolegend	155509
BV421 anti mouse Ly-6G	1/200	1A8	Biolegend	127628
BV605 anti mouse CD11b	1/800	M1/70	Biolegend	101257
BV650 anti mouse CD4	1/200	RM4-5	Biolegend	100546

3.3.5 Cultivos de células de la CP estimulados con el fluido de la CP de ratones vírgenes o inyectados con IL-4c

Se sacrificaron ratones WT vírgenes o inyectados vía i.p. con 1 µg de IL-4 en forma de IL-4c (IL-4 en complejo con el anticuerpo anti IL-4 11B11 en relación de masa

1:5) 48 horas antes para generar los fluidos de la CP (FCP y FCP(IL-4c) respectivamente). Para ello, los ratones fueron procesados según lo descrito en la sección 3.2.1, con la excepción de que realizó solamente un lavado peritoneal con 1 mL de medio completo, de modo que el fluido colectado pudiera ser utilizado directamente como medio de cultivo para las células. A continuación, se centrifugaron las células y se recuperó el sobrenadante para ser utilizado como FCP o FCP(IL-4c) dependiendo de su origen.

Por otro lado, se obtuvieron células de la CP de ratones WT vírgenes o inyectados 72 horas antes con medio tioglicolato estéril envejecido 4 % m/v, y se cultivaron como se describió en las secciones 3.3.1 y 3.3.2. Luego de 24 horas desde la siembra, se realizó el recambio de medio y se estimularon las células con 80 ng/mL de IL-4 como se describió previamente, a diferencia de que, en lugar de utilizar medio completo para alcanzar el volumen final del cultivo, se adicionó el FCP o FCP(IL-4c). Las células estimuladas se incubaron en estufa de cultivo a 37°C con 5 % v/v de CO_2, por 48 horas, y finalmente se cosecharon como se detalló anteriormente para ser analizadas por citometría de flujo.

De manera adicional, se estimularon células de la CP de ratones inyectados 72 horas antes con medio tioglicolato 4 % m/v, con distintas versiones del FCP concentrado siguiendo el mismo protocolo. Por un lado, se concentró el FCP utilizando filtros de centrífuga de 5000 KDa (Sigma, M-0286), hasta alcanzar un volumen cinco veces menor al de partida (FCP 5x). Además, se ultracentrifugó el FCP por 1 hora a 100.000 g y la fracción insoluble obtenida se re-suspendió en medio completo, de manera de alcanzar una concentración tres veces superior a la inicial (FCP ultra 3x).

3.3.6 Cultivos de células de la CP en condiciones de hipoxia

Se obtuvieron células de la CP de ratones WT vírgenes o inyectados 72 horas antes con medio tioglicolato 4 % m/v, y se cultivaron como se describió en las secciones 3.3.1 y 3.3.2. Luego de 24 horas desde la siembra, se realizó el recambio de medio y se estimularon las células con 80 ng/mL de IL-4 o 40 ng/mL de M-CSF como se describió previamente. Inmediatamente, la placa de cultivo fue transferida a una sub-cámara hermética dentro del incubador de cultivo con la posibilidad de regular el % O_2 a 1 o 7 % v/v dependiendo el experimento. Como control de normoxia, se realizó otra placa de cultivo con las mismas condiciones de estimulación y se incubó por fuera de la sub-cámara en condiciones tradicionales de cultivo, donde el % de O_2 no está regulado y por lo tanto su concentración corresponde es cercana al atmosférico (18.6 % v/v) (266).

3.3.7 Co-cultivos de células de la CP o macrófagos purificados con células de bazo

Se obtuvieron células de la CP de ratones WT o CD40 KO, según lo descrito en la sección 3.2.1, y los macrófagos se purificaron siguiendo el protocolo detallado en la sección 3.2.1.1. Asimismo, se aislaron células totales del bazo de un animal CD40 KO, conforme a lo descrito en la sección 3.2.2. A continuación, se co-cultivaron 1.5 x 10^5 macrófagos purificados o 3 x 10^5 células totales de la CP de ratones WT o CD40 KO con 6 x 10^5 esplenocitos de ratones CD40 KO , en pocillos de placas de 48 pocillos, en un volumen final de 250 µL por pocillo, en medio completo. Se dejaron adherir las células por 24 horas y se posteriormente estimularon con 80 ng/mL de IL-4 por 48 horas. Para las condiciones con macrófagos purificados, se incluyó además el anticuerpo MR1 o su control, a concentración final 10 µg/mL. Una vez finalizado el experimento, se cosecharon las células como se describió previamente y se analizó la expresión de marcadores M(IL-4) por citometría de flujo.

3.4 Experimentos *in vivo*.

3.4.1 Experimentos de bloqueo de CD40L

3.4.1.1 Bloqueo de CD40L y estudio de las respuestas de los macrófagos peritoneales basales a la IL-4

Se inyectaron ratones WT vía i.p. con 1 µg de IL-4 en forma de IL-4c por ratón o vehículo solamente, en conjunto con 100 µg de anticuerpo MR1 o anticuerpo control. Luego de 48 horas, se sometió a los ratones a eutanasia y se obtuvieron las células de la CP como se describió en la sección 3.2.1. Dieciséis horas antes del sacrificio de los animales se inyectó vía subcutánea (s.c.) 1 mg de BrdU o 0.5 mg de EdU por ratón.

Se analizaron los macrófagos y células B de la CP mediante citometría de flujo siguiendo la estrategia de definición celular ilustrada en la Figura 3.4. Además, se cuantificó la producción de marcadores M(IL-4) por ELISA en el fluido correspondiente al primer mililitro del lavado peritoneal.

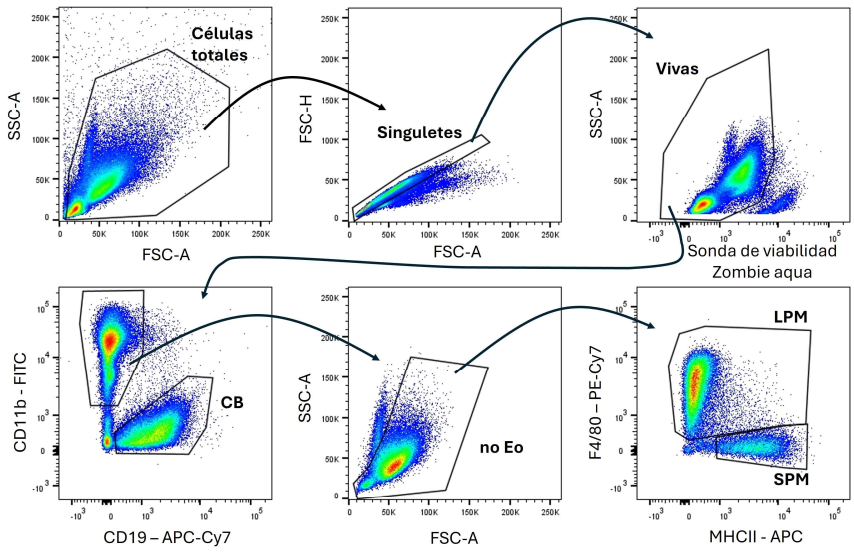


Figura 3.4. Estrategia de definición celular utilizada para la detección de macrófagos y células B en los experimentos de CP *in vivo*. Se muestra la estrategia de definición celular utilizada para identificar LPM, SPM y células B (CB), excluyendo los eosinófilos (Eo) según su alta complejidad celular (SSC^{high}), de la CP por citometría de flujo utilizando citómetro un FACSCanto II. Los paneles de anticuerpos utilizados para la definición de las células variaron según la disponibilidad de los anticuerpos conjugados a distintos fluorocromos. La totalidad de los anticuerpos se describe en la Tabla 3.2.

Por otro lado, se colectaron también muestras de hígado, las cuales se procesaron para obtener la fracción no parenquimal tal como se describió en la sección 3.2.3. Esta fracción se utilizó para analizar la proliferación de las KC en respuesta a la IL-4, en presencia de anticuerpo MR1, en comparación con el anticuerpo control, mediante citometría de flujo, utilizando la estrategia de definición celular ilustrada en la Figura 3.5.

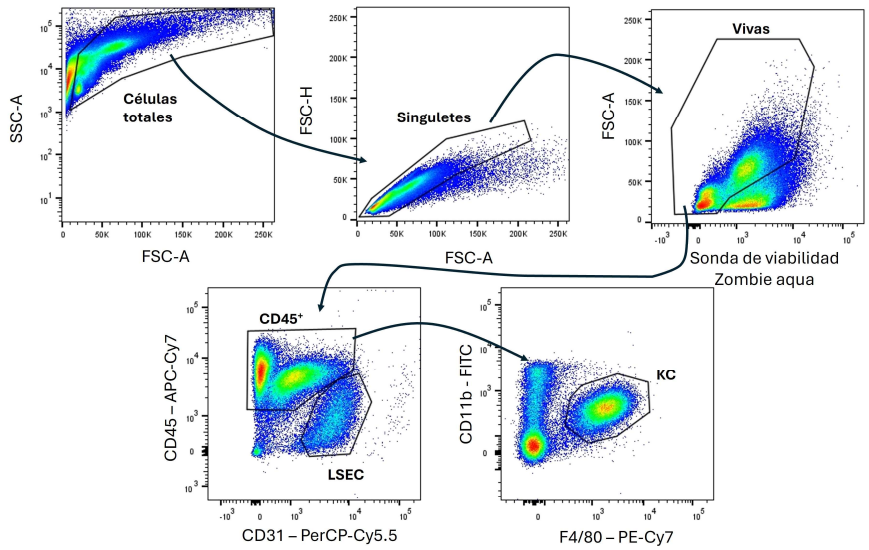


Figura 3.5. Estrategia de definición celular utilizada para el estudio de las células de Kupffer. Se muestra la estrategia de definición celular utilizada para discriminar las KC en la fracción no parenquimal hepática por citometría de flujo, utilizando un FACSCanto II. Los paneles de anticuerpos utilizados para la definición de las células variaron según la disponibilidad de los anticuerpos conjugados a distintos fluorocromos. La totalidad de los anticuerpos se describe en la Tabla 3.2.

3.4.1.2 Bloqueo de CD40L y estudio de las respuestas de los macrófagos inflamatorios a la IL-4

Se inyectaron ratones WT vía i.p. con 800 µL de medio de tioglicolato estéril envejecido, al 4 % m/v, con el objetivo de inducir una respuesta inflamatoria en la CP. Luego de 72 horas, se inyectaron los mismos animales con IL-4c en conjunto con el anticuerpo MR1 o su control isotípico, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.4.1.1. Una vez obtenidas las células de la CP, se procedió a analizar las respuestas de los IMacs a la IL-4 mediante citometría de flujo, aplicando la estrategia de definición celular ilustrada en la Figura 3.6.

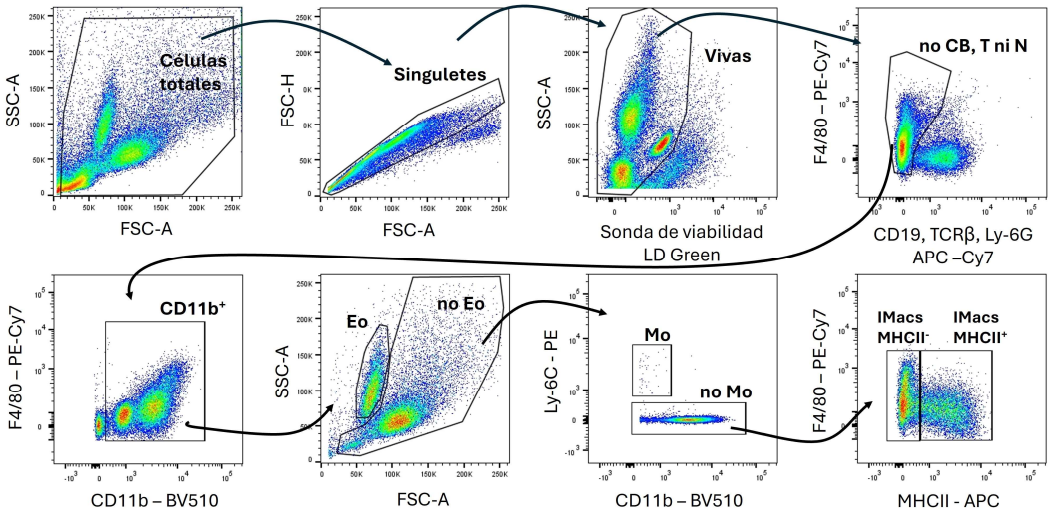


Figura 3.6. Estrategia de definición celular utilizada para el estudio de los IMacs de la CP. Se inyectaron ratones WT vía i.p. con medio de tioglicolato al 4 % m/v. Luego de 72 horas, se inyectaron los mismos animales con IL-4c o con vehículo solamente, junto con el anticuerpo MR1 o su control. A las 48 horas, se sacrificaron los ratones y se analizaron los IMacs por citometría de flujo. Se muestra la estrategia de definición celular utilizada para detectar IMacs MHCII^{+} e IMacs MHCII^{-}, excluyendo células B (CB), células T (T) y neutrófilos (N) mediante un "*dump gate*", así como monocitos (Mo) a través de Ly-6C y eosinófilos (Eo) según su alta complejidad celular (SSC^{high}). El análisis se realizó en un citómetro FACSCanto II. Los paneles de anticuerpos utilizados para la definición de las células variaron según la disponibilidad de los anticuerpos conjugados a distintos fluorocromos. La totalidad de los anticuerpos empleados se describe en la Tabla 3.2.

3.4.1.3 Bloqueo de CD40L y estudio de las poblaciones celulares presentes en la CP

Se inyectaron ratones WT vía i.p. con dos dosis consecutivas de 100 µg del anticuerpo MR1 o su control por ratón, separadas por 24 horas. Luego de 24 horas desde la última inyección, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron las células de la CP como se describió en la sección 3.2.1. Se analizó por citometría de flujo las poblaciones celulares presentes en la CP en presencia del MR1 en comparación con el control.

3.4.2 Experimentos de comparación de macrófagos WT *vs* CD40 KO

3.4.2.1 Estudio comparativo de las respuestas a IL-4 en macrófagos peritoneales WT y CD40 KO

Se inyectaron ratones WT y CD40 KO vía s.c. con 1 µg de IL-4 en forma de IL-4c o con vehículo solamente. A las 48 horas, se sometió a los animales a eutanasia y se obtuvieron las células de la CP, como se describió en la sección 3.2.1. Dieciséis horas antes del sacrificio de los animales, se inyectó vía s.c. 1 mg de BrdU por ratón. Se analizó la proliferación, polarización M(IL-4) y expresión de MHCII de los macrófagos por citometría de flujo utilizando la estrategia de definiciones celulares de la Figura 3.4.

3.4.2.2 Estudio comparativo de las poblaciones presentes en la CP de ratones WT y CD40 KO

Se obtuvieron células de la CP de ratones WT y CD40KO como se describió en la sección 3.2.1. Se analizaron por citometría de flujo las poblaciones de células de la CP, así como la presencia de células T reguladoras ($FOXP3^+$) en la cavidad de los ratones WT en comparación con los CD40 KO.

3.4.3 Experimentos con el anticuerpo agonista de CD40

3.4.3.1 Determinación de la dosis óptima del anticuerpo agonista de CD40

Se inyectaron ratones WT vía i.p. con 1, 5 o 10 µg del anticuerpo agonista de CD40 (1C10) (Biolegend, 102812) o su anticuerpo control isotípico IgG2a de rata (GL117, PolPharma) solamente en la dosis más alta. Luego de 24 horas, se sacrificaron los ratones, se obtuvieron las células de la CP como se describió en la sección 3.2.1, y se determinó en éstas, por citometría de flujo en combinación con conteo de células totales, los números totales de macrófagos y células B, así como su estado de activación. Además, se evaluó macroscópicamente la apariencia del hígado como un indicador del posible daño hepático inducido por el anticuerpo, y se tomaron fotografías para su registro.

3.4.3.2 Estudio de las respuestas de los macrófagos a la IL-4 en presencia del anticuerpo agonista de CD40

En base a los resultados obtenidos durante la puesta a punto, se inyectaron ratones WT vía i.p. con 3 µg del anticuerpo 1C10 o su control, en conjunto con 1 µg de IL-4 en forma de IL-4c o con vehículo solamente. Dieciséis horas antes del sacrificio de los animales, se inyectó vía s.c. 1 mg de BrdU por ratón. Pasadas 48 horas desde la inyección de los estímulos, se sometieron los animales a eutanasia y se obtuvieron las células de la CP como se describió en la sección 3.2.1. Se analizó mediante citometría de flujo el fenotipo de los macrófagos presentes en la cavidad, y en base a los resultados obtenidos, se optó por utilizar una estrategia de definición celular basada en la expresión de F4/80 y Tim4 (Figura 3.7). Posteriormente, se evaluaron mediante citometría de flujo la proliferación de los macrófagos y las células B de la CP, así como la activación y polarización M(IL-4) exclusivamente en los macrófagos.

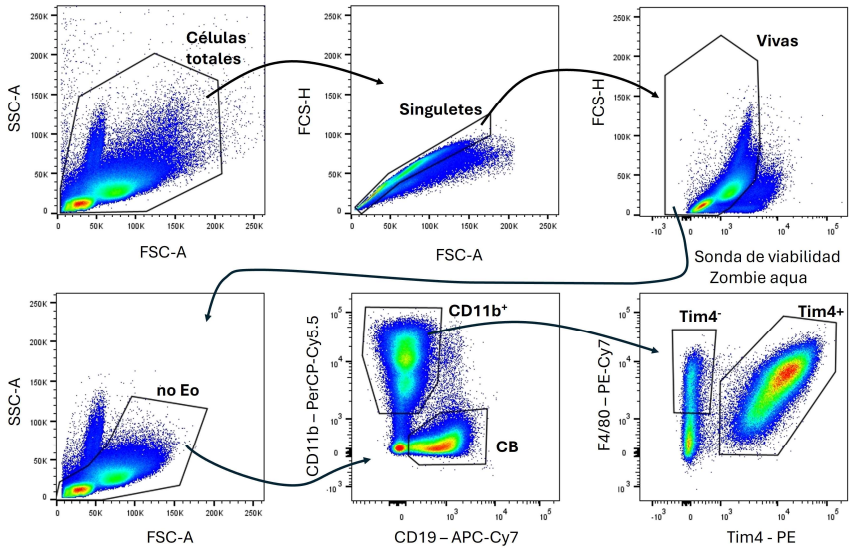


Figura 3.7. Estrategia de definición celular utilizada para el estudio de los macrófagos Tim4⁺ y Tim4⁻ de la CP. Se muestra la estrategia de definición celular utilizada para discriminar los macrófagos Tim4⁺ y Tim4⁻, así como las células B (CB) de la CP por citometría de flujo utilizando un citómetro FACSCanto II. Esta estrategia fue utilizada particularmente en los experimentos donde se administró el anticuerpo agonista de CD40. Los paneles de anticuerpos utilizados para la definición de las células variaron según la disponibilidad de los anticuerpos conjugados a distintos fluorocromos. La totalidad de los anticuerpos empleados se describe en la Tabla 3.2.

3.4.4 Experimentos de transferencia de macrófagos

3.4.4.1 Marcado de macrófagos peritoneales *in vivo* con PKH26-PCL

Se inyectaron ratones WT o CD40 KO vía i.p. con 175 pmoles de PKH26-PCL (Sigma, PKH26PCL) por ratón, en 250 µL, utilizando el diluyente proporcionado por el fabricante. Los colorantes PKH son colorantes fluorescentes unidos a largas cadenas lipofílicas, que se utilizan para marcar membranas en condiciones específicas mediante la intercalación de sus cadenas en la bicapa lipídica, con la ayuda de un diluyente específico. El derivado PKH26-PCL (del inglés *Phagocytic Cell Labelling*) utiliza un diluyente que induce la formación de agregados o partículas de colorante, lo que favorece su captación por células fagocíticas.

Luego de 24 horas de administrada la sonda, se sometieron los animales a eutanasia y se colectaron las células de la CP como se describió en la sección 3.2.1. Se analizó la incorporación de la sonda PKH26-PCL en los LPM y SPM mediante citometría de flujo (Figura 3.8), siguiendo la estrategia de definición celular ilustrada en la Figura 3.4. Se observó que más del 90 % de los LPM incorporaron la sonda, mientras que solo un 66,5 % de los SPM presentaron señal positiva para PKH26-PCL. Sin embargo, cabe aclarar que, según la definición utilizada, la población de SPM incluye también otras células, entre ellas DC que, al no ser fagocíticas, no incorporan o incorporan muy poca sonda, apareciendo como negativas para la misma.

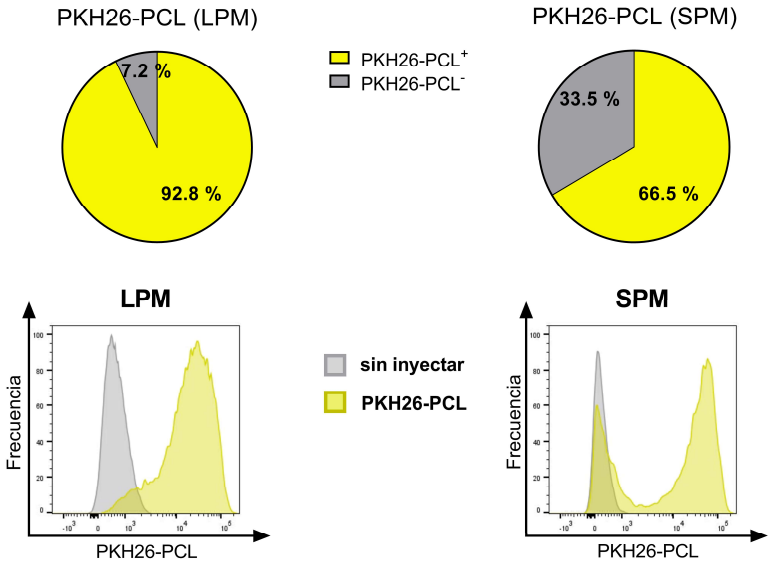


Figura 3.8. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 3.8. Análisis de incorporación de PKH26-PCL en los macrófagos de la CP. Se inyectaron ratones WT vía i.p. con 175 pmoles por ratón de PKH26-PCL. Luego de 24 horas, los animales se sometieron a eutanasia y se obtuvieron las células totales de la CP para analizar la incorporación de la sonda en los LPM y SPM. Se muestra el resultado de un experimento e histogramas representativos comparando la marca de la sonda en ratones inyectados con PKH26-PCL y no inyectados.

3.4.4.2 Estudio de la proliferación y polarización M(IL-4) de los macrófagos de la CP marcados con PKH26-PCL

Se marcaron *in vivo* los macrófagos de la CP de ratones WT, como se describió en la sección 3.4.4.1. Además, se inyectaron ratones WT vía i.p. con PBS como controles sin sonda. Luego de 24 horas de administrada la sonda o el PBS, se inyectaron los mismos ratones vía s.c. con 1 µg de IL-4 en forma de IL-4c, 20 µg de CSF1-Fc (amablemente cedido por el Dr. David Hume de la University of Queensland, Australia (267)) o PBS como control de vehículo. Pasadas 48 horas, se obtuvieron las células de la CP como se describió en la sección 3.2.1, y se analizó la proliferación y la polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales, en presencia *versus* ausencia de la sonda.

3.4.4.3 Transferencia de macrófagos WT o CD40 KO PKH26-PCL$^+$ a la CP de ratones WT

Se marcaron *in vivo* los macrófagos de 5 ratones WT y 5 CD40 KO tal como se describió en la sección 3.4.4.1. Luego de 24 horas de inyectada la sonda, se sacrificaron los animales y se colectaron las células de la CP como se describió en la sección 3.2.1, con la excepción de que los lavados peritoneales se realizaron utilizando PBS estéril. Se analizó el nivel de incorporación de la sonda en los macrófagos presentes en las células de CP de cada ratón mediante citometría de flujo, ya que cuando se realiza inyección i.p. siempre existe cierta probabilidad de inyectar en el lumen intestinal en lugar de la CP. Se agruparon las muestras que presentaron macrófagos con señal positiva para PKH26-PCL, generando así una mezcla de células de la CP de ratones WT y otra de CD40 KO, ambas con presencia verificada de la sonda. A continuación, se purificaron los macrófagos a partir de las muestras unificadas, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.1.1. Posteriormente, se inyectaron 2 x 10^5 macrófagos purificados marcados o 3 x 10^5 células totales de la CP (conteniendo macrófagos marcados) de ratones WT o CD40

KO (ratones donantes), en 250 µL de PBS, en la CP de ratones WT (ratones receptores). Luego de 7 días de realizada la transferencia de macrófagos, se inyectaron los mismos ratones vía i.p., en el caso de la transferencia de células totales de la CP, y vía s.c., en el caso de la transferencia de macrófagos purificados, con 1 µg de IL-4 en forma de IL-4c o vehículo solamente. El intervalo de 7 días entre la transferencia y la estimulación se definió en base a una puesta a punto previa, en la que se observó que los macrófagos transferidos no son capaces de responder a la IL-4c cuando ésta se administra a las 24 horas de la transferencia.

Dieciséis horas antes del sacrificio de los animales, se inyectó vía s.c. 1 mg de BrdU por ratón. Pasadas 48 horas desde la administración de la IL-4c, se sometieron los ratones a eutanasia y se obtuvieron las células de la CP tal como se describió en la sección 3.2.1. Se analizó la proliferación y polarización M(IL-4) de los macrófagos (definidos como en la Figura 3.4) del donante (PKH26-PCL$^+$) y del receptor (PKH26-PCL$^-$), mediante citometría de flujo.

3.4.5 Experimentos de transferencia de macrófagos y células T CD4$^+$

Se purificaron las células T CD4$^+$ del bazo de un ratón CD40 KO como se describió en la sección 3.2.2.1. A continuación, se inyectaron 1.5 x 10^5 de las células T CD4$^+$ purificadas, en 250 µL de PBS, a la CP de ratones CD40 KO (ratones receptores). Al día siguiente, se obtuvieron las células de la CP de 5 ratones WT o de 5 ratones CD40 KO, que fueron unificadas por genotipo para generar una mezcla de células de donantes WT y otra de donantes CD40 KO. Seguidamente, se purificaron los macrófagos siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.1.1, realizando los lavados peritoneales con PBS en lugar de medio de cultivo. Acto seguido, se inyectaron 2 x 10^5 macrófagos purificados de animales WT o CD40 KO, en 250 µL de PBS o solo vehículo, a la CP de los ratones CD40 KO receptores, los cuales habían recibido células T CD4$^+$ 24 horas antes.

Luego de 48 horas desde la transferencia de los macrófagos, se sometieron los ratones a eutanasia y se colectaron las células de la CP tal como se describió en la sección 3.2.1. Se analizó la expresión de CD40L, tanto de superficie como total, en las células T CD4$^+$ mediante citometría de flujo, utilizando la estrategia de definición celular ilustrada en la Figura 3.10.

3.4.6 Experimentos de infección con *H. polygyrus*

Se infectaron ratones WT vía p.o. (mediante gavage oral) con 200 L3 de *H. polygyrus* (amablemente cedidas por el Dr. John Grainger de la *Division of Immunology, Immunity to Infection and Respiratory Medicine* de la Universidad de Manchester, UK). A los 6 días, los ratones infectados, así como ratones controles que no fueron intervenidos, se inyectaron vía i.p. con 100 µg por ratón de anticuerpo MR1 o su control. Luego de 72 horas de administrados los anticuerpos, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron muestras de la CP y del hígado, que se procesaron tal como se describió en las secciones 3.2.1 y 3.2.3 respectivamente. Además, se colectaron muestras del intestino de los ratones infectados para el recuento de los gusanos adultos. Para ello se extrajo el intestino delgado desde el duodeno hasta el íleon y se colocaron en PBS a temperatura ambiente. A continuación, se cortaron los segmentos de intestino de forma longitudinal con tijeras de punta roma y se colocaron sobre una gasa, formando una bolsa suspendida dentro de un tubo de 50 mL con PBS, asegurándose que la muestra estuviera en contacto con el líquido. Los tubos se incubaron toda la noche a 37 °C, permitiendo que los gusanos migraran fuera del intestino, atravesaran la gasa y decantaran hacia el fondo del tubo. A día siguiente, se descartaron las gasas con su contenido, y se incubaron los tubos con los gusanos a 56°C durante 2 horas. Luego, se colectaron los gusanos en el fondo del tubo utilizando una pipeta Pasteur, y se transfirieron a pozos de placas de 12 pocillos para su fijación con formalina. Posteriormente se contaron los gusanos bajo lupa utilizando placas de Petri con rejilla para conteo.

Por otro lado, las muestras obtenidas de la CP se analizaron por citometría de flujo siguiendo la estrategia de definiciones celulares ilustrada en la Figura 3.9a. Para definir a los macrófagos peritoneales, se empleó un repertorio de marcadores más amplio que el utilizado en el resto de los experimentos, dado que la infección por *H. polygyrus* genera alteraciones en la proliferación y reclutamiento de estas células, lo que requiere un análisis más detallado para su caracterización (Figura 3b). En particular, se destaca la presencia de macrófagos con el fenotipo de maduración intermedia denominado CPM, previamente mencionado (143,148). Por lo tanto, se incorporaron los marcadores CD73, CD102 y FRβ, previamente definidos como indicadores de trayectorias de macrófagos de cavidades (143). Al mismo tiempo, no se priorizó incorporar marcadores que permitieran distinguir entre SPM en el sentido estricto e IMacs similares a SPM (ver sección 1.3.1 de Introducción). Mientras que en el contexto de la inflamación estéril inducida por medio tioglicolato (Sección 3 del capítulo de Resultados), se nombra a los macrófagos mayoritarios presentes, F4/80^{bajos}, “IMacs”, en los experimentos de infección por *H. polygyrus* (Sección 6 del capítulo de Resultados) se decidió utilizar las definiciones celulares descritas por Finlay y colaboradores para la infección por

otro helminto (*Litosomosoides sigmodontis*) en cavidad pleural (143). Por analogía a las definiciones utilizadas por Finlay y colaboradores, a los macrófagos F4/80^{bajos} y F4/80^{medios} presentes en infección por *H. polygyrus* se les llama SPM y CPM respectivamente, más allá que se trata, mayoritariamente, de IMacs, posiblemente mezclados con fracciones menores de SPM en el sentido estricto y de células intermedias entre estas últimas y los LPM.

Paralelamente, se analizaron las muestras de hígado mediante citometría de flujo, utilizando una estrategia de definición celular basada en la ilustrada en la Figura 3.5, con la incorporación adicional de marcadores para células B, monocitos, eosinófilos y células T CD4$^+$.

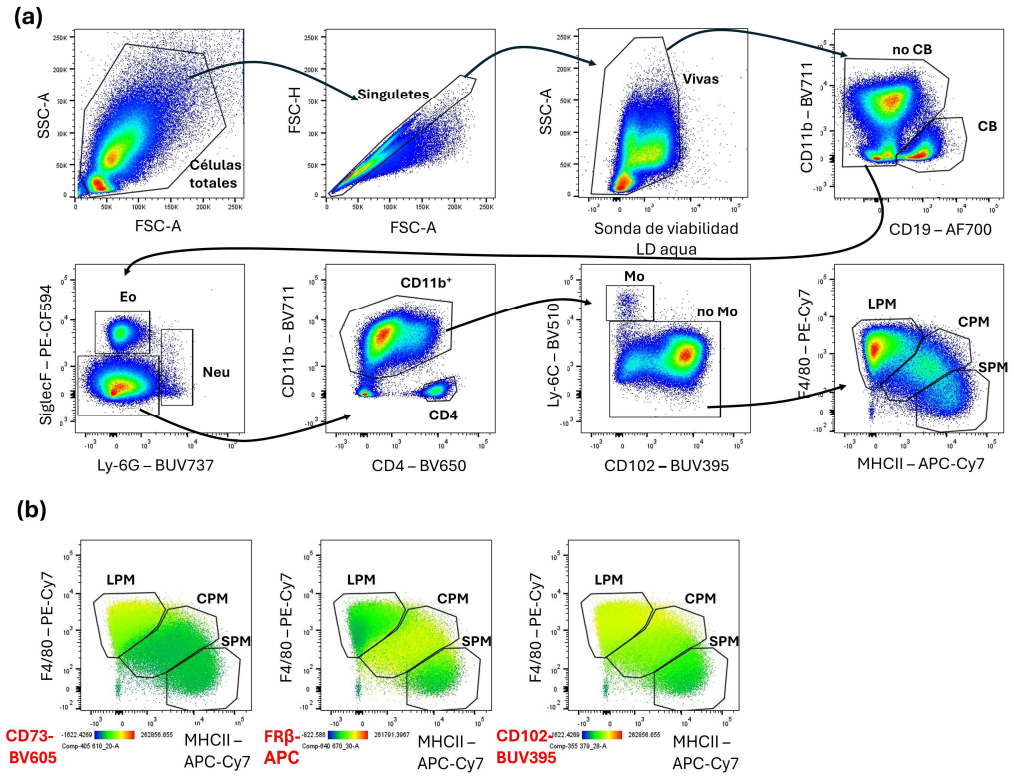


Figura 3.9. Estrategia de definición celular utilizada para el estudio de las células de la CP en contexto de la infección por *H. polygyrus*, con énfasis en las trayectorias de macrófagos. Se muestra la estrategia de definición celular utilizada para detectar en la CP células B (CB), neutrófilos (Neu), eosinófilos (Eo), monocitos (Mo), células T CD4$^+$, LPM, CPM y SPM (a) por citometría de flujo utilizando un citómetro LSRFortessa X-20. Además, se ilustra la expresión de los marcadores de trayectoria CD73, FRβ y CD102 mediante *heat maps* para los LPM, CPM y SPM (b). Es importante aclarar que, como se explica en el texto principal, para los experimentos de infección por *H. polygyrus*, se tomó la acepción laxa de SPM y CPM, que incluye (mayoritariamente) a IMacs.

3.5 Técnicas de análisis

3.5.1 Citometría de flujo

Para las muestras obtenidas de los experimentos *in vitro*, una vez cosechadas las células de la placa de cultivo, se transfirieron en su totalidad a los pozos de una placa de 96 pocillos con fondo en V para proceder con la tinción para citometría de flujo. En cuanto a las muestras de los experimentos *in vivo*, ya sean de CP, hígado o bazo, se sembraron 5 x 10^5 células en placas de 96 pocillos con fondo en V. A continuación, se lavaron las células con 100 µL de PBS por pocillo y se centrifugó la placa a 350 g durante 5 minutos a 4°C. Luego se incubaron las células con la sonda de viabilidad deseada (Tabla 3.2) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Brevemente, las sondas de viabilidad utilizadas en citometría de flujo se unen covalentemente a los grupos aminos de las proteínas y funcionan según la integridad de la membrana celular. En células vivas, la sonda solo puede unirse a las proteínas de la superficie celular, generando una fluorescencia de baja intensidad. En cambio, en células muertas, la membrana dañada permite que la sonda ingrese y se una a las proteínas intracelulares, lo que resulta en una fluorescencia de mayor intensidad. De este modo, estas sondas permiten diferenciar entre células viables y no viables.

Posteriormente, se bloquearon los receptores Fc por el agregado de 15 µL de *buffer* FC adicionado con 25 ng de anti CD16/CD32 y 15 % v/v suero normal de rata (URBE, Facultad de Medicina), durante 20 minutos a 4°C. A continuación, se incubaron las células durante 30 minutos a 4 °C con los anticuerpos conjugados a fluorocromos (Tabla 3.2) para la tinción de marcadores de superficie. Para ello, se preparó la mezcla de anticuerpos a una concentración 2x de la deseada, y se adicionaron 25 µL de la mezcla a cada pozo con células. Seguidamente, se realizaron 2 lavados con 150 µL de *buffer* FC por pocillo y se procedió al fijado de las células. Las células se fijaron mediante incubación con 100 µL por pocillo de una solución de paraformaldehído (Sigma, P-6148) al 2 % m/v en PBS, pH 7.2 durante 20 minutos a 4 °C, y posteriormente se lavaron 2 veces con *buffer* FC. Cuando se midieron solamente marcadores de superficie, las células se re-suspendieron en 150 µL por pocillo de *buffer* FC para ser adquiridas en el citómetro.

Para la detección de marcadores intracelulares, una vez fijadas y lavadas, se incubaron las células con 100 µL por pocillo de un *buffer* de permeabilización (Thermo Fisher, 00-8333-56) durante toda la noche a 4°C. Para la detección de marcadores intranucleares como Ki-67, BrdU, EdU o FOXP3, se fijaron las células utilizando en el *kit FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer* (Thermo Fisher, 00-5523-00) y luego se incubaron durante toda la noche a 4°C con 100 µL del

componente de fijado/permeabilización diluido, siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, se lavaron las células 2 veces con el *buffer* de permeabilización y se incubaron con 50 µL de la mezcla de anticuerpos deseada, preparada en el mismo *buffer*, durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, se realizaron 2 lavados adicionales con 100 µL por pocillo del *buffer* de permeabilización, y las células se re-suspendieron en 150 µL por pocillo de *buffer* FC para su adquisición en el citómetro.

Cuando se utilizaron anticuerpos biotinilados durante el marcado intracelular, una vez finalizado el paso de tinción y los lavados, se incubaron las células con 50 µL de la estreptavidina conjugada deseada, preparada en *buffer* de permeabilización, durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, se lavaron y se re-suspendieron en *buffer* FC como se describió previamente, para ser adquiridas en el citómetro.

Para la detección de BrdU, luego de la fijación y los lavados, se incubaron las células con 100 µL de una solución de PBS conteniendo 765 KU/mL de ADNasa (Sigma, D5025) y 4.2 mM de $MgCl_2$, a 37°C durante 30 minutos. Para la detección de EdU se utilizó el *kit Click-iT™ Plus EdU Flow Cytometry Assay* siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se lavaron las células 2 veces con 100 µL por pocillo de PBS y se procedió a la tinción intracelular como se describió previamente.

Los datos de las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) del IH o en el LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) de la *Flow Cytometry Core Facility* de la Universidad de Manchester, UK. Los datos se analizaron empleando el software FlowJo versión 10.10.0.

Los análisis multidimensionales de los experimentos de infección con *H. polygyrus* se realizaron utilizando el software FlowJo junto con el *plugin* UMAP v2.1. Para el análisis de las células de la CP, en cada experimento se generó un archivo compilado con los datos de los ratones correspondientes a cada condición experimental, y el algoritmo UMAP fue aplicado tomando como variables de entrada los parámetros FSC, SSC, CD11b, F4/80, MHCII, FRβ, CD73, CD102, CD19, Ly-6C, Siglec-F, Ly-6G y CD4. El mismo procedimiento se empleó para el análisis de las células $CD45^+$ del hígado, aunque en este caso se consideraron los parámetros FSC, SSC, CD11b, F4/80, Ly-6C, Siglec-F y CD4 para la generación de los mapas.

Tabla 3.2. Anticuerpos y sondas de viabilidad utilizados en citometría de flujo. Se detallan los anticuerpos y sondas fluorescentes, o su reactivo secundario cuando corresponda, utilizadas en citometría de flujo.

Anticuerpo o sonda	Dilución o concentración	Clona	Proveedor	# catálogo	Reactivo secundario
Alexa Fluor 488 anti mouse CD11b	1/400	M1/70	Biolegend	101217	
Alexa Fluor 700 anti mouse CD19	1/400	6D5	Biolegend	115528	
Alexa Fluor 700 anti mouse I-A/I-E	1/400	M5/114.15.2	Biolegend	107622	
anti mouse RELM-α	1 µg/mL	Polyclonal Rabbit antibody	PeproTech	500-P214	Zenon Rabbit IgG labeling kit – PE o AF647– (Thermo Ficher, Z25355 y Z25308)
anti mouse Ym1/Chil3-biotinilado	4 µg/mL	Polyclonal Goat IgG	R&D	BAF2446	Estreptavidina-APC (1/200) – (Biolegend, 405207) o Estreptavidina-BV421 (Biolegend, 405226)
APC anti BrdU	1/50	Bu20a	Biolegend	339809	
APC anti mouse CD40	1/400	3/23	Biolegend	124612	
APC anti mouse FRβ	1/400	10/FR2	Biolegend	153306	
APC anti mouse I-A/I-E	1/400	M5/114.15.2	Biolegend	104614	
APC anti mouse Ly-6G	1/200	1A8	Biolegend	127614	
APC-Cy7 anti mouse CD11b	1/400	M1/70	Biolegend	101226	
APC-Cy7 anti mouse CD19	1/200	6D5	Biolegend	115530	
APC-Cy7 anti mouse CD4	1/200	RM4-5	Biolegend	100526	
APC-Cy7 anti mouse CD44	1/200	IM7	Biolegend	103028	

APC-Cy7 anti mouse CD45	1/400	30-FT11	Biolegend	103116	
APC-Cy7 anti mouse I-A/I-E	1/400	M5/114.15.2	Biolegend	107628	
APC-Cy7 anti mouse TCRβ	1/200	H57-597	Biolegend	109220	
anti mouse NK-1.1 biotinilado	1/400	PK136	Biolegend	108704	Estreptavidina - APC (1/200) (Biolegend, 405207)
BUV395 anti mouse CD102	1/400	3C4(mIC2/4)	BD Bioscience	740227	
BUV737 anti mouse Ly-6G	1/400	1A8	BD Bioscience	741813	
BV421 anti mouse CD19	1/400	6D5	Biolegend		
BV421 anti mouse CD31	1/200	390	Biolegend	102423	
BV421 anti mouse CD62L	1/200	MEL-14	Biolegend	107628	
BV421 anti mouse Ki-67	1/50	B56	BD Bioscience	562899	
BV421 anti mouse Ly-6C	1/200	HK1.4	Biolegend	128032	
BV510 anti mouse CD11b	1/200	M1/70	Biolegend	101263	
BV510 anti mouse CD8a	1/200	53-6.7	Biolegend	100752	
BV510 anti mouse Ly-6C	1/400	HK1.4	Biolegend	128033	
BV605 anti mouse CD73	1/400	TY/11.8	Biolegend	127215	
BV605 anti mouse Ly-6C	1/400	HK1.4	Biolegend	128036	
BV650 anti mouse CD4	1/400	RM4-5	Biolegend	100555	
BV711 anti mouse CD11b	1/400	M1/70	Biolegend	101242	
BV711 anti mouse F4/80	1/400	BM8	Biolegend	123147	
BV785 anti mouse CD45	1/400	30-F11	Biolegend	103146	
BV785 anti mouse CD8a	1/400	53-6.7	Biolegend	100750	

BV786 anti mouse Ki-67	1/100	B56	Biolegend	563756	
eFluor 450 anti mouse Ki-67	1/50	SolA15	eBioscience (Thermo Fisher)	48-5698-82	
eFluor 506 anti moise CD4	1/100	GK1.5	eBioscience (Thermo Fisher)	69-0041-82	
FITC anti mouse CD11b	1/1000	V36 nanobody	Amablemente cedido por G. González-Sapienza.		
FITC anti mouse CD4	1/400	GK1.5	Biolegend	100406	
FITC anti mouse Ki-67	1/100	SolA15	eBioscience (Thermo Fisher)	11-5698-82	
LIVE/DEAD™ Fixable Aqua	1/250	No aplica	Invitrogen (Thermo Ficher)	L34957	
LIVE/DEAD™ Fixable Green	1/500	No aplica	Invitrogen (Thermo Fisher)	L23101	
LIVE/DEAD™ Fixable Far Red	1/500	No aplica	Invitrogen (Thermo Fisher)	L10120	
Pacific Blue anti mouse Ly-6C	1/200	HK1.4	Biolegend	128014	
PE anti mouse CD154	1/200	MR1	Biolegend	106506	
PE anti mouse CD170 (Siglec-F)	1/200	S17007L	Biolegend	155506	
PE anti mouse F4/80	1/200	BM8	Biolegend	123109	
PE anti mouse Ly-6C	1/200	HK1.4	Biolegend	128008	
PE anti mouse Tim-4	1/200	RMT4-54	Biolegend	130006	
PE-Cy7 anti mouse CD117 (c-kit)	1/400	ACK2	Biolegend	135112	

PE-Cy7 anti mouse CD31	1/400	MEC13.3	Biolegend	102524	
PE-Cy7 anti mouse F4/80	1/200	BM8	Biolegend	123114	
PE-Cy7 anti mouse I-A/I-E	1/400	M5/114.15.2	Biolegend	107630	
PE-Cy7 anti mouse TCRβ	1/400	H57-597	Biolegend	109221	
PE-CF594 anti mouse Siglec-F	1/400	E50-2440	BD Bioscience	562757	
PerCP-Cy5.5 anti mouse CD19	1/400	6D5	Biolegend	115533	
PerCP-Cy5.5 anti mouse CD31	1/200	390	Biolegend	102419	
PerCP-Cy5.5 anti mouse I-A/I-E	1/400	M5/114.15.2	Biolegend	107626	
PerCP-Cy5.5 anti mouse CD11b	1/400	M1/70	Biolegend	101228	
PerCP-Cy5.5 anti mouse CD8a	1/200	56-6.7	Biolegend	100734	
Zombie Aqua™ Fixable Viability	1/250	No aplica	Biolegend	423102	

3.5.1.1 Medida de CD40L total y de superficie en las células T CD4⁺ de la CP

Una parte importante de esta tesis se centra en el papel del CD40L endógeno presente en condiciones basales en las células T CD4⁺. Para ello, fue fundamental contar con una medición confiable, reproducible y lo suficientemente sensible de CD40L en estas células, tanto para experimentos *in vivo* como *in vitro*. Esto implicó que, para mejorar la sensibilidad de la detección de CD40L en el equipo BD FACSCanto II, se utilizara un panel con la mínima cantidad de marcadores posible. Además, se seleccionó un fluorocromo particularmente brillante y con poco derrame de otros canales para la detección de CD40L, a fin de minimizar el solapamiento espectral. En este caso, la ficoeritrina (PE) resultó ser la más adecuada. Adicionalmente, se procuró evitar el uso de anticuerpos marcados con fluorocromos que se excitaran con el mismo láser que el utilizado para la detección

CD40L (láser azul de 488 nm), con el objetivo de reducir interferencias y maximizar la resolución de la señal. Teniendo en cuenta esto, para permitir la correcta detección de CD40L en el FACSCanto II, se puso a punto un panel con una estrategia de definiciones celulares para las células T $CD4^+$ y sus subtipos vírgenes, de memoria central y efectoras (Figura 3.10). El uso de este panel simplificado no fue necesario al emplear el LSRFortessa X-20, ya que la detección de CD40L no se vio afectada por la utilización simultánea de múltiples marcadores. En ese sentido, la cuantificación de CD40L en los distintos tipos celulares de la CP se realizó con el LSRFortessa X-20 utilizando la estrategia de definiciones celulares ilustrada en la Figura 3.12.

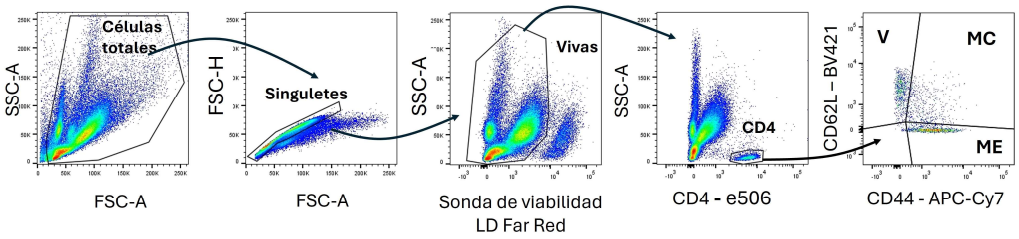


Figura 3.10. Estrategia de definición celular para la detección de CD40L en Las células T $CD4^+$ de la CP. Se muestra la estrategia de definición celular empleada para cuantificar la expresión de CD40L en superficie y total (dependiendo de si están permeabilizadas o no), en las células T $CD4^+$ de la CP, así como sus subtipos vírgenes (V), de memoria central (MC) o memoria efectora (ME) en base a la expresión de CD62L y CD44 por citometría de flujo utilizando un citómetro FACSCanto II.

3.5.1.2 Medida de CD40 en la superficie de los macrófagos y células B de la CP

En concordancia con lo mencionado previamente para CD40L, la detección de CD40 en macrófagos y células B de la CP requirió el uso de un anticuerpo anti CD40 conjugado a un fluorocromo lo suficientemente brillante, así como de paneles simplificados para maximizar la señal. En primer lugar, se optó por un anticuerpo anti CD40 conjugado a aloficocianina (APC). Además, se diseñaron un panel y una estrategia de definiciones celulares para detectar CD40 en la superficie de los LPM y SPM, y un segundo panel destinado a su detección en células B (Figura 3.11). Cuando se midió la expresión de CD40 en los macrófagos en un contexto inflamatorio, se utilizó una estrategia de definición celular basada en la presentada en la Figura 3.11, con la salvedad de que los IMacs, mayoritarios en esas condiciones, son $F4/80^{bajo}$ con expresión variable de MHCII.

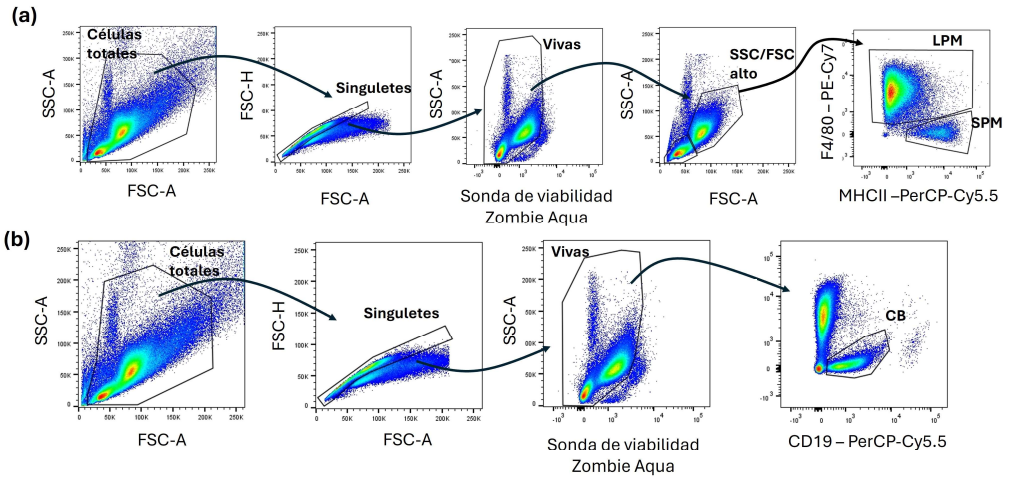


Figura 3.11. Estrategia de definición celular para la detección de CD40 en macrófagos y células B de la CP. Se muestra la estrategia de definición celular empleada para cuantificar la expresión de CD40 en la superficie de los LPM y SPM (a), así como en las células B (CB) (b) de la CP utilizando dos paneles independientes simplificados que permiten la correcta detección por citometría de flujo utilizando un FACS Canto II.

3.5.1.3 Estudio de la composición de la CP por citometría de flujo

El análisis de los distintos tipos celulares presentes en la CP mediante citometría de flujo requirió la utilización simultánea de varios marcadores fenotípicos para el reconocimiento de las células inmunes. Para ello, se empleó la estrategia de definiciones celulares ilustrada en la Figura 3.12 para la CP en contexto basal, y en la Figura 3.13 para la CP en contexto inflamatorio, utilizando un LSRFortessa X-20. Sin embargo, en los experimentos realizados en el IH, donde no se disponía de un equipo con la capacidad de detectar un número igualmente alto de marcadores a la vez, se recurrió al uso de más de un panel, empleando los mismos marcadores fenotípicos para cada tipo celular y siguiendo estrategias de definiciones celulares similares.

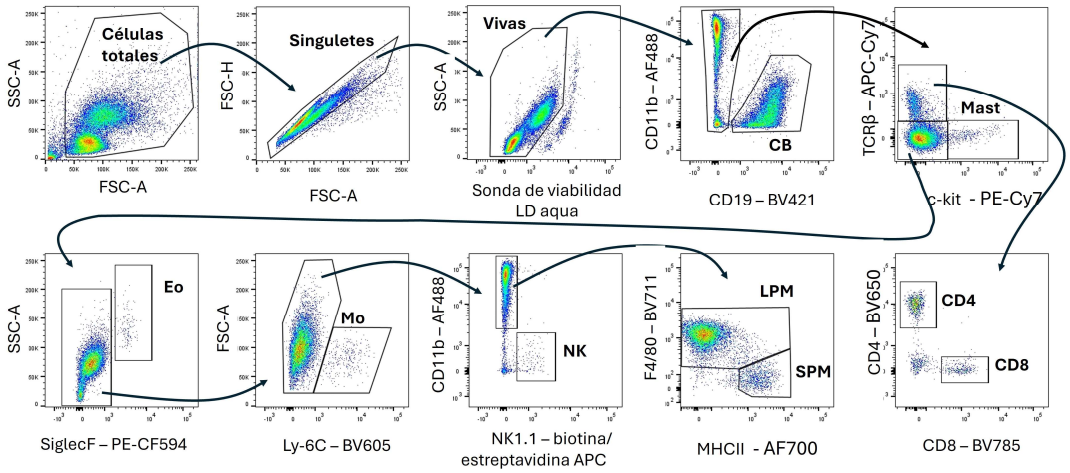


Figura 3.12. Estrategia de definición celular extendida utilizada para el estudio de las células de la CP en contexto basal. Se muestra la estrategia de definición celular utilizada para detectar células B (CB), mastocitos (Mast), eosinófilos (Eo), monocitos (Mo), células NK (NK), células T CD4$^+$, células T CD8$^+$, LPM y SPM en la CP citometría de flujo utilizando un LSRFortessa X-20.

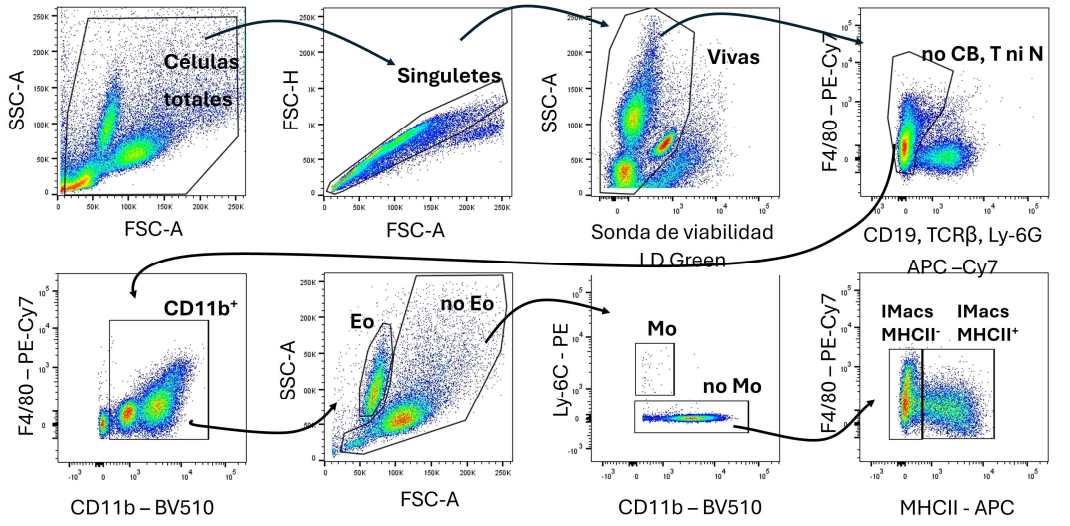


Figura 3.13. Estrategia de definición celular extendida utilizada para el estudio de las células de la CP en contexto inflamatorio. Se inyectaron ratones WT vía i.p. con medio tioglicolato 4 % m/v. Se muestra la estrategia de definición celular utilizada para detectar luego de 72 horas desde la inyección del medio tioglicolato las células B (CB), mastocitos (Mast), eosinófilos (Eo), monocitos (Mo), células NK (NK), células T CD4$^+$, células T CD8$^+$, IMacs MHCII$^+$ e IMacs MHCII$^-$ de la CP por citometría de flujo utilizando un LSRFortessa X-20.

3.5.2 Cuantificación de mediadores solubles por ELISA

Para determinar la concentración de mediadores solubles en los sobrenadantes de cultivo o en el primer mililitro del lavado peritoneal, se empleó la técnica de ELISA (de la sigla en inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de tipo captura. Se emplearon *kits* comerciales (Tabla 3.3) excepto para RELM-α, para la cual se usó un ELISA con pares de anticuerpos y estándar comerciales (Tabla 3.4).

Brevemente**,** se sensibilizaron placas de ELISA de alta capacidad de adsorción de proteínas con 50 µL por pocillo del anticuerpo de captura, diluido según corresponda, y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. A continuación, se bloquearon los pocillos con 100 µL de una solución de PBS conteniendo 1 % m/v de BSA o 10 % v/v de SFB, durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se sembraron 50 µL de cada muestra, en la dilución correspondiente, o de diluciones seriadas de la solución estándar, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se adicionaron 50 µL del anticuerpo de detección biotinilado e incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se agregaron 50 µL de estreptavidina conjugada a peroxidasa (proveniente en cada *kit* o Thermo Fisher, 434323) por 30 minutos a temperatura ambiente, seguidos de 100 µL de una solución de 0.096 mg/mL 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma, T2885) y 0.004 % v/v de H_2O_2 en *buffer* acetato 0.1 M pH 5.5 para el revelado. Finalmente, se detuvo la reacción colorimétrica por el agregado de 50 µL por pocillo de una solución de H_2SO_4 0.18 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Luego de cada una de las incubaciones mencionadas, la placa se lavó con una solución de PBS conteniendo 0.05 % v/v Tween-20.

Tabla 3.3. *Kits* de ELISA comerciales empleados para la cuantificación de mediadores solubles.

Mediador soluble	**Proveedor**	**# catálogo**
Ym1	R&D	DY2446
IL-6	BD	554400
TNF-α	R&D	DY410

Tabla 3.4. ELISA para la cuantificación de RELM-α. Se detallan los reactivos empleados en cada uno de los pasos del ELISA de captura, puesto a punto en el laboratorio de la Dra. Judith E. Allen de la Univesidad de Manchester, UK, para la cuantificación de RELM-α. Se indica también la cantidad de lavados (L) realizados entre los pasos con PBS-Tween 0.05 % v/v.

Anticuerpo de captura	**L**	**Bloqueo**	**L**	**Estándar**	**L**	**Anticuerpo de detección**	**L**	**Estreptavidina-peroxidasa**	**L**
anti RELM-α hecho en conejo (Peprotech, 500-P214) 1 µg/mL en Na_2CO_3 0,1 M, $NaHCO_3$ 0,1 M pH 9.6	3	PBS BSA 1 % m/v o 10 % SFB	3	RELM- α murino (Peprotech, 450-26)	3	anti RELM-α hecho en conejo biotinilado (Peprotech, 500-P214Bt) 0,25 µg/ml) en solución de bloqueo	3	Estreptavidina-HPR (Thermo Fisher, 434323) 0.5 µg/ml	8

3.6 Análisis estadístico.

Los datos provenientes de dos o más experimentos independientes se analizaron mediante estadística paramétrica de dos vías. Específicamente, se utilizó el paquete de *software* robustlmm R para la estimación robusta de modelos lineales de efectos mixtos, y luego se obtuvieron las medias marginales estimadas con la ayuda del paquete emmeans R (268,269). En los casos en los que se disponía de un solo experimento, se tomó el criterio de realizar un test ANOVA o test-t paramétrico solamente cuando se contaba con al menos 4 muestras de individuos independientes por grupo. En el caso de contar con un numero de muestras menor, no se realizó estadística. En todos los análisis que implicaban comparaciones entre más de dos grupos experimentales se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg para minimizar la tasa de falsos positivos (270). Los datos apareados, correspondientes a células donantes y receptoras dentro de cada ratón, se analizaron mediante prueba t pareada. Cuando fue necesario homogeneizar las varianzas de diferentes grupos, los datos se transformaron logarítmicamente, como se indica en cada caso; en tales casos, se muestran las medias geométricas (en lugar de las medias aritméticas) en los gráficos correspondientes.

4 Resultados

El capítulo de Resultados de este trabajo está divido en siete secciones. Las primeras cuatro, aunque abordan objetivos distintos, se enfocan en el papel del CD40L endógeno en ausencia de interacciones específicas inducidas, principalmente en el contexto de la CP, pero también en el del hígado. En la Sección 1, se determinó que las células T $CD4^+$ de la CP expresan CD40L de manera constitutiva y se analizó el impacto de este sobre las respuestas a la IL-4 de los macrófagos en cultivos de células de la CP sin fraccionar. En la Sección 2, se detallaron los subtipos de células T $CD4^+$ de la CP que expresan CD40L y cómo éste es regulado por la presencia de CD40 en los macrófagos. Además, se estudió en profundidad, mediante distintos modelos *in vivo*, si el CD40L endógeno basal influye en las respuestas a la IL-4 de los macrófagos peritoneales y de las KC en condiciones no inflamatorias. La Sección 3 se enfocó en el estudio del impacto del CD40L endógeno en las respuestas de los macrófagos peritoneales *in vivo* en un contexto inflamatorio. En la Sección 4, se describe un hallazgo inesperado que sugiere un posible papel de la interacción CD40-CD40L constitutivo en la regulación de las poblaciones celulares presentes en la CP en condiciones homeostáticas.

Las siguientes secciones se alejan del enfoque en el CD40L endógeno. En la Sección 5, se estudió cómo los agonistas exógenos solubles de CD40 regulan los efectos de la IL-4 en los macrófagos peritoneales, tanto *in vitro* como *in vivo*. En la Sección 6, se utilizó el modelo de infección con *H. polygyrus* y se determinó que durante la infección aumenta la expresión de CD40L en las células T $CD4^+$ de la CP, lo que aporta evidencia indirecta de presentación de antígeno en el sitio, y se analizó si el CD40L presente en este contexto influye en las respuestas de los macrófagos peritoneales frente a la infección. Se estudió también si el CD40L repercute en la proliferación de las KC en este modelo de infección.

Finalmente, en la Sección 7 se describen esfuerzos realizados en pos de descifrar cual es el estímulo faltante para la proliferación *in vitro* de los macrófagos peritoneales en respuesta a la IL-4.

4.1 Resultados 1: CD40L endógeno en contexto basal: experimentos *in vitro*

4.1.1 Descriptiva de la expresión de CD40 y CD40L en las células de la CP

En primer lugar, se verificó que los macrófagos de la CP expresan CD40 y se determinó como influye la IL-4, estímulo más ampliamente utilizado en este trabajo, sobre dicha expresión. Se midió la expresión de CD40 en la superficie de los LPM, SPM y células B. Como se observa en la Figura 4.1.1, los LPM expresan más CD40 en comparación con los SPM y las células B. Además, en ratones inyectados con IL-4c, se observaron niveles más bajos de CD40 en LPM y SPM en comparación con los ratones control, a diferencia de las células B, en las cuales la IL-4 indujo un aumento en la expresión de CD40.

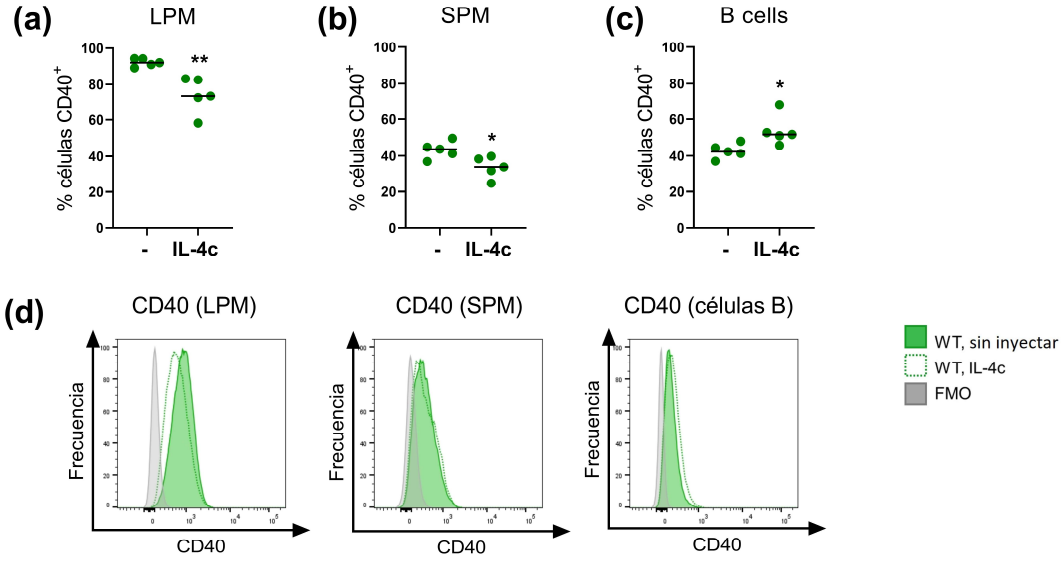


Figura 4.1.1. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.1.1. Los LPM de la CP expresan más CD40 en su superficie que los SPM y las células B. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con IL-4c y luego de 48 horas los ratones fueron sometidos a eutanasia para el análisis de las células de la CP. Se determinó la expresión de CD40 en los LPM (a), SPM (b) y células B (c) mediante citometría de flujo. Las células fueron definidas como se describe en la Figura 3.11 del capítulo de Materiales y Métodos. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, e histogramas representativos para cada condición (d). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a un único experimento y el análisis estadístico se realizó con el test paramétrico test-t. Los asteriscos indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

A continuación, se cuantificó la expresión de CD40L en la superficie de las células T CD4⁺ de la CP de ratones WT y CD40 KO a distintos tiempos de cultivo en presencia y ausencia de IL-4 (Figura 4.1.2). Consistentemente con datos ya publicados para bazo y ganglios linfáticos (220), a tiempo cero, los niveles de CD40L de superficie fueron mayores en las células T CD4⁺ de animales CD40 KO que en los de WT (los datos de CD40L *ex vivo* se abordarán de manera más extensa en la Sección 2 del capítulo de Resultados). Además, se observó que la IL-4 induce una disminución en los niveles de CD40L, siendo este efecto más pronunciado en las células T CD4⁺ de ratones CD40 KO, donde a las 24 horas los niveles de CD40L alcanzaron valores similares a los observados en ratones WT en ausencia de IL-4.

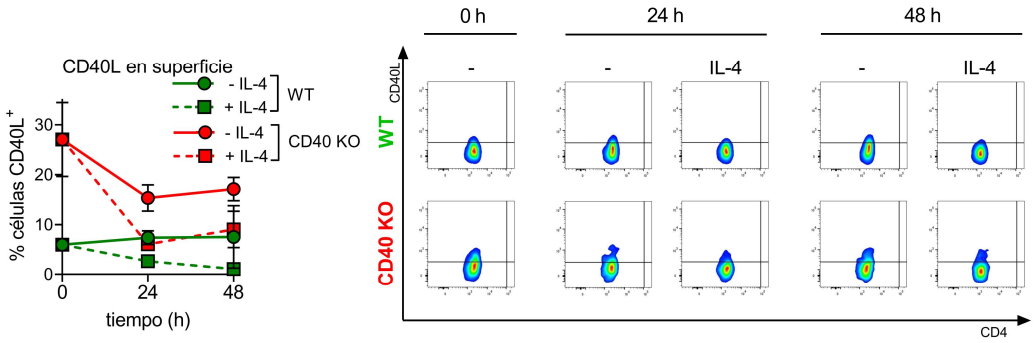


Figura 4.1.2. El cultivo de células T CD4⁺ de la CP tiende a reducir la expresión superficial de CD40L, especialmente en presencia de IL-4. Se cultivaron células totales de la CP de ratones C57BL/6 WT o CD40 KO en ausencia y presencia de IL-4, y se analizó sobre la superficie de las células T CD4⁺ (definidas como en la Figura 3.10 del capítulo de Materiales y Métodos) la expresión de CD40L a diferentes tiempos, mediante citometría de flujo. El umbral de detección fue delimitado con el control de fluorescencia FMO correspondiente. Se muestran promedios y desvíos estándar correspondientes a 2-5 medidas para cada condición, colectadas a partir de dos experimentos. Se muestran también diagramas de citometría de flujo representativos.

4.1.2 La ausencia del CD40L endógeno no modifica la polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales en cultivo

Una vez confirmada la presencia de CD40 en los macrófagos y de CD40L en las células T CD4⁺ de CP, se analizó la relevancia de esta posible interacción en las respuestas de los macrófagos a la IL-4 en cultivo. Como se mencionó previamente, en presencia de IL-4, los macrófagos se polarizan hacia el fenotipo M(IL-4) y, entre otros cambios, expresan RELM-α, Ym1 y Arginasa-1. Por lo tanto, en una a primera instancia, se cultivaron células de la CP de ratones WT y se estimularon con IL-4 en presencia del anticuerpo bloqueante de CD40L (MR1) o el anticuerpo control (IgG). Luego de 48 horas en cultivo se observó que el bloqueo CD40L endógeno no influye sobre la expresión de RELM-α ni Ym1 (Figura 4.1.3).

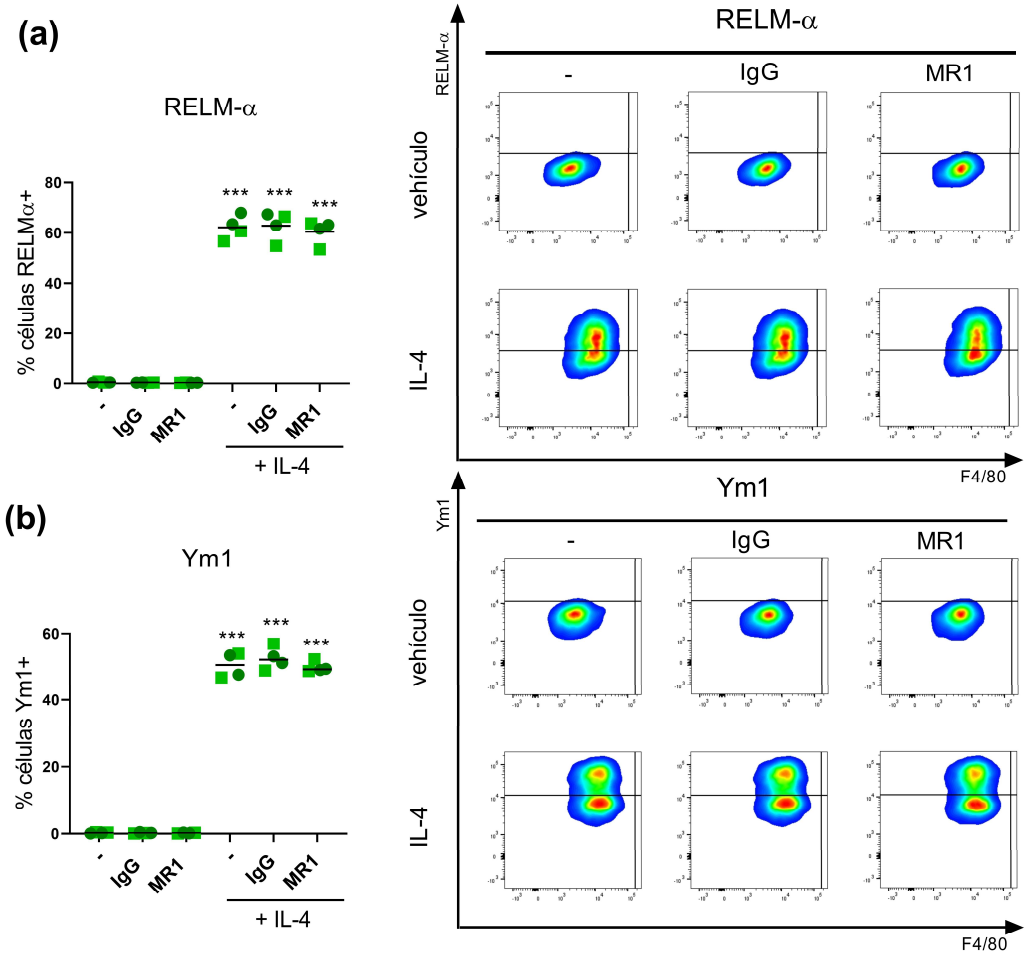


Figura 4.1.3. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.1.3. La presencia del CD40L endógeno no afecta la polarización M(IL-4) de macrófagos peritoneales en cultivo. Se estimularon células peritoneales de ratones C57BL/6 WT con IL-4 en presencia del anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1"), anticuerpo control ("IgG"), o vehículo solamente. Luego de 48 horas en cultivo se midió la expresión de RELM-α (a) e Ym1 (b) en los macrófagos peritoneales (definidos como en la Figura 3.3 del capítulo de Materiales y Métodos) por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada muestra y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (con distintas formas y tonalidades de verde). Cada punto representa una réplica técnica dentro de cada experimento. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

A raíz de este resultado, se llevaron a cabo una serie de experimentos para confirmar la ausencia de efecto del CD40L endógeno en la polarización M(IL-4) *in vitro* de los macrófagos de la CP. En primer lugar, considerando que las células T $CD4^+$ son el único tipo celular de la CP que expresa CD40L (como se detallará en la Sección 2 del capítulo de Resultados), se utilizaron cultivos de células de CP sin células T $CD4^+$ (Figura 4.1.4a) y se evaluó si los macrófagos allí presentes expresan niveles normales de RELM-α, Ym1 y Arginasa-1 en respuesta al a IL-4. Para ello, se cultivaron las muestras de CP de las que se habían eliminado las células T totales empleando anticuerpos unidos a una fase sólida (PEC - T), así como la fracción inicial (PEC total) y la re-constituída (PEC – T + T) como controles, y se estimularon con IL-4 por 48 horas. Como se observa en la Figura 4.1.4b-e, la ausencia de células T, en particular las $CD4^+$, no tuvo efecto sobre la expresión de ninguno de los marcadores M(IL-4) analizados. Sin embargo, debido a que en estos experimentos se observó una gran dispersión en los datos, con resultados variables entre ensayos, se decidió emplear otras metodologías para abordar el mismo objetivo.

En consecuencia, se purificaron macrófagos y células T $CD4^+$ de la CP de ratones WT mediante *cell sorting*, y se cultivaron los macrófagos solos en presencia o ausencia de células T $CD4^+$, también purificadas con la misma metodología. Se estimularon dichos cultivos con IL-4 para la determinación de RELM-α e Ym1 en los sobrenadantes de cultivo (Figura 4.1.4f-g). En concordancia con lo observado previamente, los macrófagos fueron capaces de responder a la IL-4 incluso en ausencia de otras células.

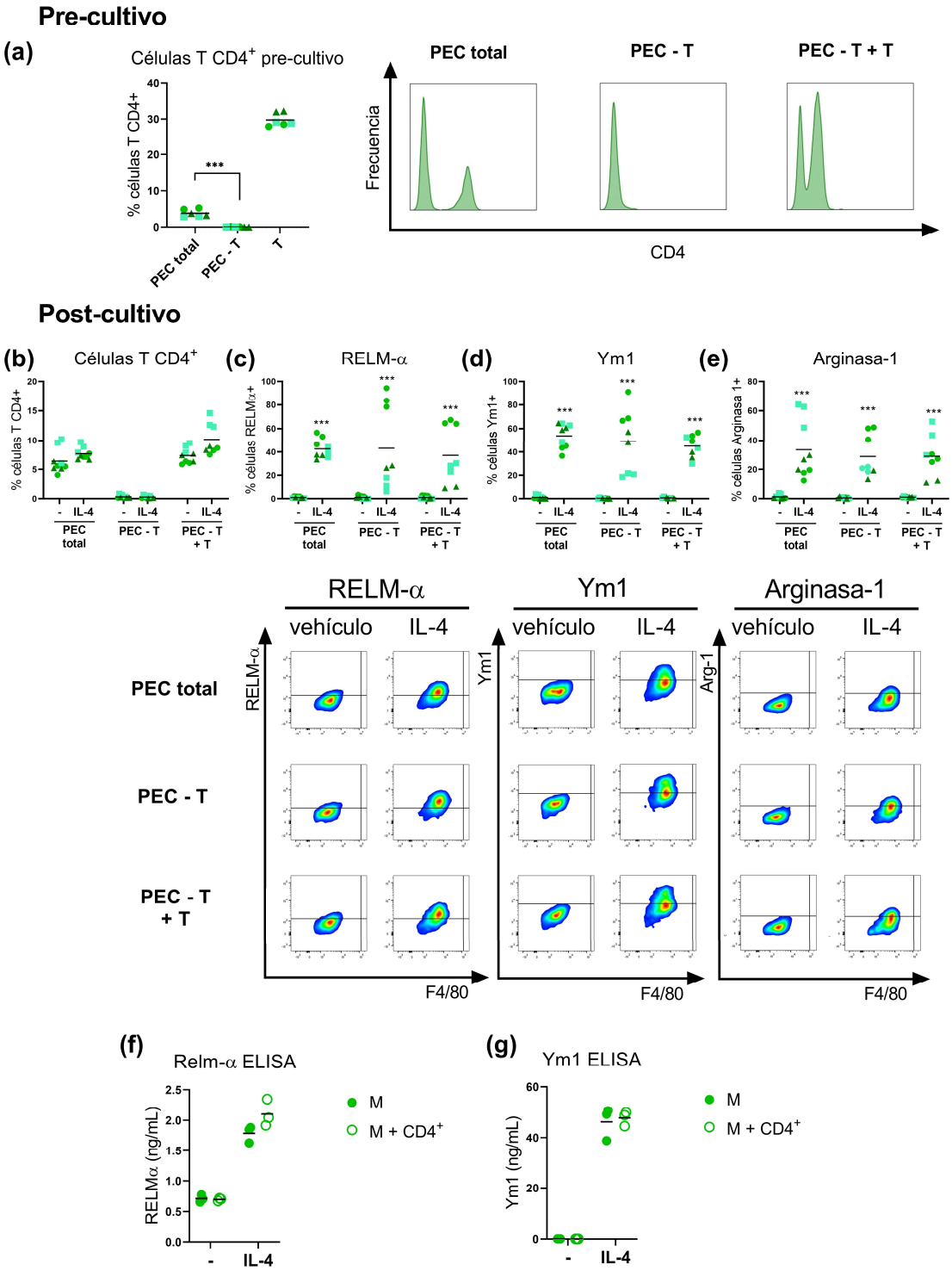


Figura 4.1.4. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.1.4. La ausencia de células T CD4⁺ no modifica la polarización M(IL-4) de macrófagos presentes en cultivos de células de CP. Se eliminaron, usando anticuerpos inmovilizados, las células T de la mezcla de células de CP y se evaluó el nivel de pureza en cuanto a la presencia de células T CD4⁺ de la fracción obtenida ("PEC - T") en comparación con la muestra de partida ("PEC total") y con la fracción enriquecida de células T ("T"), por citometría de flujo (a). Se cultivaron 3 x 10^5 células de PEC total, 2.55 x 10^5 células de PEC - T, y la misma cantidad de la última fracción con adición de 4.5 x 10^5 células T ("PEC - T + T"), y se estimularon durante 48 h con IL-4. Se evaluó la cantidad de células T CD4⁺ presentes en cada condición luego del cultivo (b), así como la expresión de RELM-α (c), Ym1 (d) y Arginasa-1 (e) en los macrófagos peritoneales por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada muestra y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Además, se purificaron macrófagos y células T CD4⁺ peritoneales por *cell sorting* y se cultivaron los macrófagos purificados solos ("M") o mezclados con las células T CD4+ ("M + CD4⁺"), estimulando con IL-4. Pasadas las 48 horas en cultivo, se midió la producción de RELM-α (f) e Ym1 (g) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. En las partes (a) a (e), se muestran datos de tres experimentos independientes (representados con distintas formas y tonalidades de verde). Cada punto representa una réplica técnica dentro de cada experimento. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

Como complemento de las metodologías mencionadas, se utilizaron células de ratones SCID, que carecen de células B y T en todo su organismo (271). Se analizaron las poblaciones celulares presentes en la CP de estos ratones, y como se presenta en la Figura 4.1.5a, se observó que los tipos celulares mayoritarios son los LPM y los eosinófilos. Además, se evaluó la posibilidad de que, en ausencia de células T CD4⁺, otros tipos celulares expresaran CD40L; sin embargo, esta hipótesis fue descartada, como se muestra en la Figura 4.1.5b-c. Una vez validado el sistema, se cultivaron células totales de la CP de ratones SCID y se estimularon con distintas concentraciones de IL-4. Se observó nuevamente que, en un contexto carente de CD40L, los macrófagos expresan RELM-α (Figura 4.1.6a) en respuesta a la IL-4. Además, se observó que hay secreción de RELM-α e Ym1 dependiente de la dosis de IL-4, según medidas sobre los sobrenadantes de cultivo (Figura 4.1.6b-c).

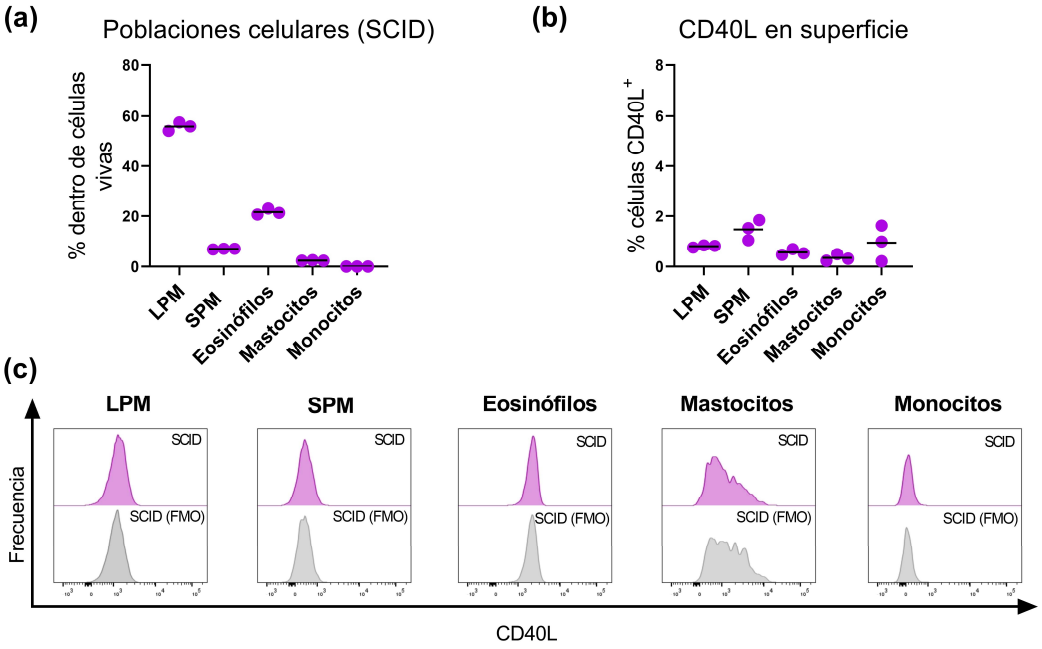


Figura 4.1.5. En la CP de ratones SCID no se detecta CD40L de superficie celular. Se analizó la composición celular de la CP basal de ratones SCID por citometría de flujo y las definiciones celulares descritas en la Figura 3.12 del capítulo de Materiales y Métodos excluyendo los marcadores para células B, T y NK (a). Además, se analizó la presencia de CD40L en los tipos celulares descritos, también por citometría de flujo (b). Se muestran también histogramas representativos de CD40L para cada tipo celular, en comparación con el control FMO (c). Los datos se representan en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes.

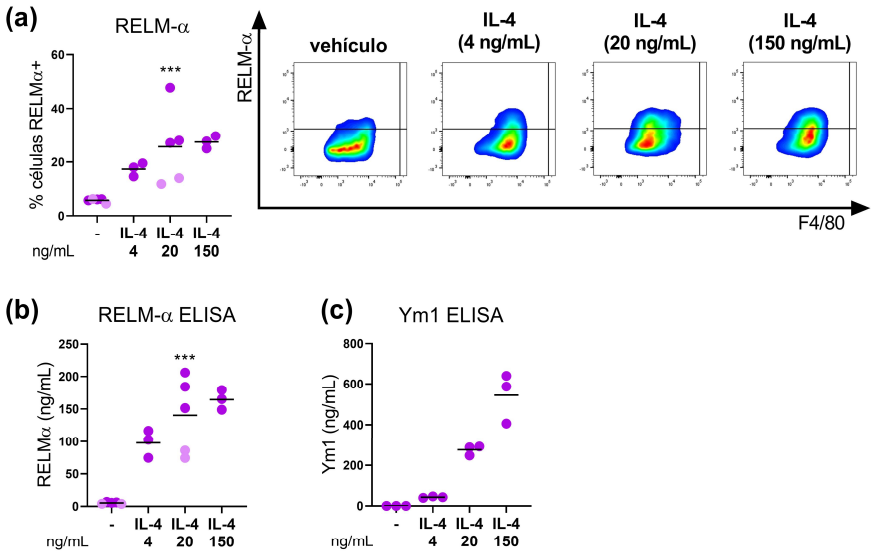


Figura 4.1.6. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.1.6. Los macrófagos peritoneales de ratones SCID se polarizan normalmente en respuesta a IL-4 en cultivo. Se obtuvieron muestras de CP de ratones SCID y se estimularon con distintas dosis de IL-4. Luego de 48 horas en cultivo se midió la expresión de RELM-α por citometría de flujo (a), así como la producción de RELM-α (b) y Ym1 (c) en los sobrenadantes de cultivo. Para la detección de RELM-α por citometría de flujo se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada muestra y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Se muestran los datos de dos experimentos independientes (en distintas tonalidades de violeta). Cada punto representa una réplica técnica dentro de cada experimento. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

4.1.3 El CD40L endógeno en alta disponibilidad no modifica la polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales en cultivo

Con el objetivo de determinar si la falta de efecto del CD40L endógeno en cultivo se debe a su baja disponibilidad, se diseñó un sistema *in vitro* en el que se expusieron macrófagos peritoneales a células T $CD4^+$ de las cuales la mayoría expresa CD40L (Figura 4.1.7). Para ello, se utilizaron células totales del bazo de un ratón CD40 KO, en el cual, como se mencionó previamente y como se muestra en la Figura 4.1.7a, la ausencia de regulación negativa por parte de CD40 permite la exposición de CD40L detectable en la superficie de más de la mitad de las células T $CD4^+$. Así, se co-cultivaron esplenocitos de ratones CD40 KO con células totales o macrófagos purificados de la CP de ratones WT. Como control, se utilizaron células de ratones CD40 KO y/o agregado del anticuerpo bloqueante MR1. Los co-cultivos fueron estimulados con IL-4, y posteriormente se evaluó la expresión de RELM-α e Ym1 en los macrófagos. Como se muestra en la Figura 4.1.4c-f, la presencia de células T $CD4^+$ con alta disponibilidad de CD40L no alteró la expresión de los marcadores M(IL-4).

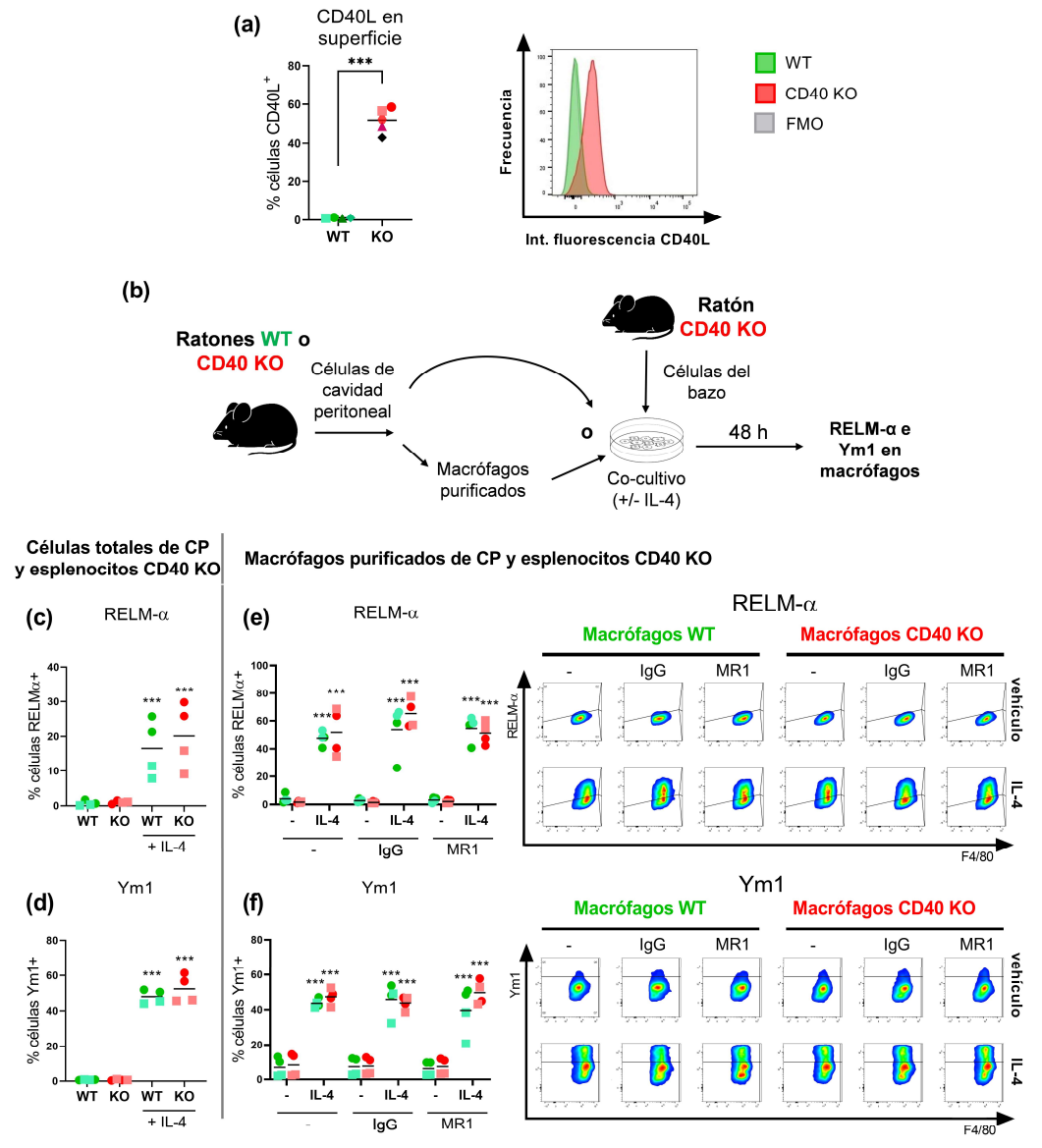


Figura 4.1.7. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.1.7. El CD40L endógeno disponible en alto nivel tampoco afecta la polarización M(IL-4) *in vitro* de los macrófagos peritoneales. Se obtuvieron muestras de bazo de animales C57BL/6 WT y CD40 KO, y se midió el nivel de CD40L en la superficie de células T $CD4^+$ esplénicas por citometría de flujo (a). Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes. Posteriormente, se co-cultivaron los esplenocitos de animales CD40 KO con células totales de la CP o macrófagos purificados de animales WT o CD40 KO, y se estimularon con IL-4 durante 48 horas como se esquematiza en (b). A continuación, se midió la expresión de RELM-α e Ym1 en los macrófagos peritoneales presentes en las células totales de la cavidad (c y d) o macrófagos purificados (e y f) por citometría de flujo. Para las condiciones con macrófagos purificados, se incluyó además el anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1") y su anticuerpo control ("IgG"). Los datos se muestran en términos de porcentajes de células positivas para cada muestra y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para WT y de rojo para CD40 KO). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

4.1.4 La presencia de LPS contaminante en el anticuerpo bloqueante de CD40L inhibe fuertemente las respuestas a la IL-4 de los macrófagos en cultivo

Durante el transcurso de este trabajo, el anticuerpo MR1 fue una herramienta ampliamente utilizada. En las etapas iniciales de la tesis, se empleó un lote de MR1 (MR1 (1)) que generaba una fuerte inhibición de la expresión de RELM-α e Ym1 inducida por IL-4 en los macrófagos, así como en su proliferación inducida por M-CSF en cultivo. Sin embargo, estos datos resultaban inconsistentes en comparación con los mostrados previamente utilizando células de CP sin células T $CD4^+$, macrófagos purificados o células de ratones SCID, que indicaban que las células T $CD4^+$, únicas fuentes detectadas de CD40L, eran dispensables para la polarización M(IL-4).

Para esclarecer esta discrepancia, se adquirió un nuevo lote del anticuerpo (MR1 (2)) y se comparó lado a lado el efecto de ambos en la producción de RELM-α e Ym1 en respuesta a la IL-4 (Figura 4.1.8a-b) y en la proliferación inducida por M-CSF de los macrófagos en cultivo (Figura 4.1.8c). Se observó que, a diferencia del MR1 (1), el MR1 (2) no afectaba la polarización M(IL-4) ni la proliferación inducida por M-CSF. Además, en presencia del MR1 (1), se detectaron altos niveles de las citocinas

proinflamatorias IL-6 y TNFα (Figura 4.1.8d-f), lo que sugirió la presencia de un contaminante en este lote.

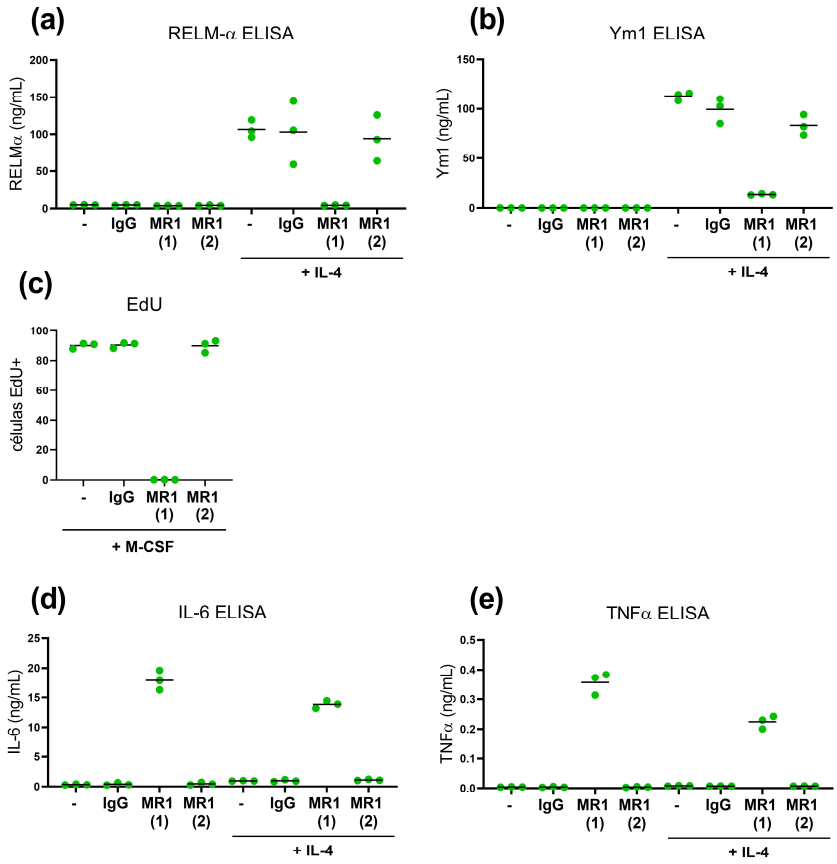


Figura 4.1.8. El LPS contaminante en el anticuerpo anti CD40L inhibe fuertemente las respuestas a la IL-4 de macrófagos peritoneales en cultivo. Se estimularon células de CP de animales C57BL/6 WT con IL-4 o M-CSF, en presencia del anticuerpo bloqueante de CD40L contaminado con 5516 EU/mg de LPS ("MR1 (1)"), el mismo anticuerpo no contaminado ("MR1 (2)") y su anticuerpo control (IgG) con niveles medidos de LPS < 2 EU/mg. Luego de 48 horas en cultivo, se cuantificó la producción de RELM-α (a) e Ym1 (b) en respuesta a IL-4 por ELISA, y la proliferación en respuesta a M-CSF por incorporación de EdU (c) por citometría de flujo. Además, se midió la producción de citoquinas proinflamatorias IL-6 (d) y TNFα (e) por ELISA. Los datos corresponden a un único experimento con tres réplicas técnicas por condición.

Finalmente, se cuantificó la concentración de LPS en ambos lotes de MR1 y en el anticuerpo control. Los valores obtenidos de endotoxinas para IgG y MR1 (2) fueron de 0.0019 y 0.0015 EU/µg de proteína, respectivamente, encontrándose dentro de

un rango esperado según lo declarado por el fabricante (< 0.01 EU/µg de proteína). En contraste, el MR1 (1) presentó una concentración de 5.5 EU/µg, confirmando así la contaminación con LPS. La dosificación del LPS fue realizada por la MSc. Emiliya Seytyagyayeva de la *Division of Cell Matrix Biology & Regenerative Medicine* de la Universidad de Manchester, UK.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que los efectos observados del MR1 (1) en las respuestas de los macrófagos peritoneales fueron consecuencia de la contaminación con LPS y no de la acción específica del anticuerpo.

En el transcurso de este trabajo, cuando se menciona el anticuerpo MR1 sin más especificaciones, se hace referencia al lote MR1 (2), libre de concentraciones significativas de contaminantes.

4.2 Resultados 2: CD40L endógeno en contexto basal: experimentos *in vivo*

4.2.1 Descriptiva del CD40L endógeno en las células de la CP

Debido a que la disponibilidad y/o los efectos del CD40L endógeno *in vitro* podrían no reflejar adecuadamente lo que ocurre en condiciones fisiológicas, se procedió a analizar estos fenómenos en un contexto *in vivo*. Para ello, se analizó en primer lugar la disponibilidad de CD40L en la CP en condiciones basales. En animales WT, el CD40L se detectó exclusivamente en células T $CD4^+$, en forma predominantemente intracelular, aunque también en superficie celular (Figura 4.2.1a-b). Además, en concordancia con lo descrito en la Sección 1, los niveles de CD40L fueron más altos en las células T $CD4^+$ de la CP de ratones CD40 KO que en las de los ratones WT (Figura 4.2.1c-d). Por otro lado, la inyección de IL-4 indujo una leve disminución en la expresión total y en superficie de CD40L en las células T $CD4^+$ de animales WT. El mismo efecto fue detectado para las células de los ratones CD40 KO, aunque en forma más débil y solamente en términos del CD40L total.

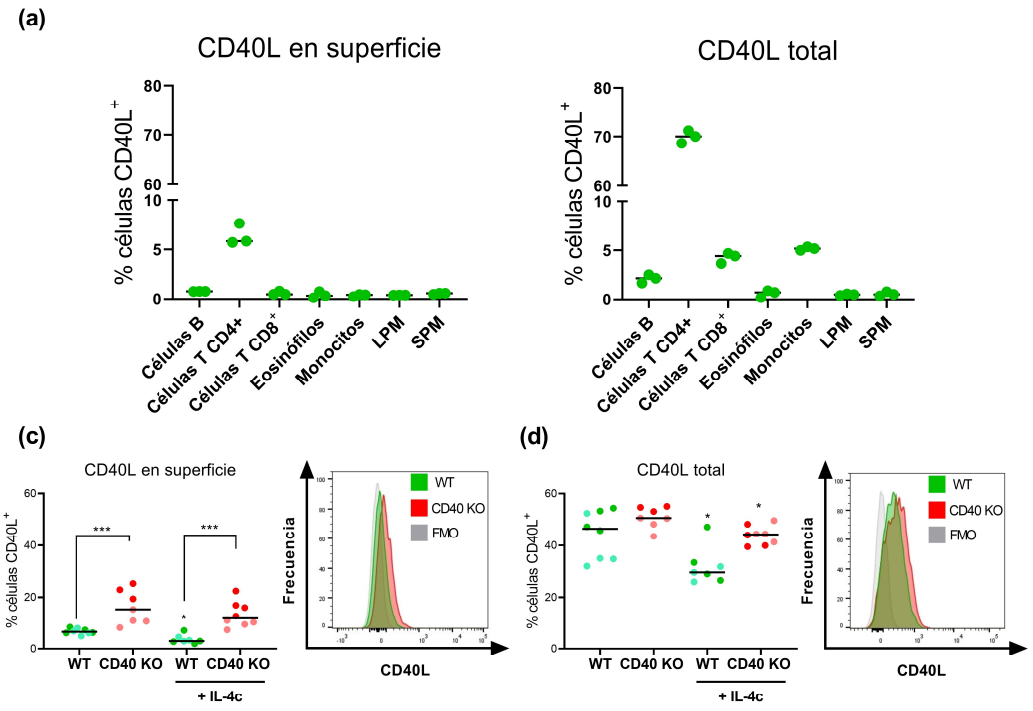


Figura 4.2.1. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.1. Las células T CD4⁺ de la CP expresan CD40L. Se obtuvieron muestras de CP de ratones C57BL/6 WT y se evaluó la expresión de CD40L en superficie (a) y total (b) en distintos tipos celulares (definidos como en la Figura 3.12 del capítulo de Materiales y Métodos, exceptuando la utilización de marcadores de mastocitos) por citometría de flujo. Además, se inyectaron ratones WT o CD40 KO vía s.c con 1 µg de IL-4c o vehículo solamente. Luego de 48 horas se sometió a los animales a eutanasia y se determinó la expresión de CD40L en superficie (c) y total (d) en las células T CD4⁺ peritoneales por citometría de flujo (definidos como en la Figura 3.10 del capítulo de Materiales y Métodos). Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, e histogramas representativos solamente para las condiciones en ausencia de IL-4c. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para WT y de rojo para CD40 KO). En (c) y (d) el análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

Posteriormente se realizó un análisis más detallado de la disponibilidad de CD40L, discriminando las células T CD4⁺ en fenotipos V, de memoria central (MC) y de memoria efectora (ME) en base a la expresión de CD62L y CD44.

Como se observa en la Figura 4.2.2, y en línea con los datos publicados para bazo (220), los niveles de CD40L en superficie tienden a ser más altos en las células V que en las que ya han tenido un encuentro previo con antígeno, tanto en animales WT como en CD40 KO. Además, el efecto regulatorio de CD40 sobre CD40L de superficie fue más fuerte en las células T CD4⁺ V, pero resultó aún existente en las de MC y de ME. Por otro lado, al contrario del CD40L de superficie, en las células V de animales WT, los niveles de CD40L total fueron más bajos que en las células de MC o ME, y la ausencia de CD40 potenció el CD40L total únicamente en las células V (Figura 4.2.2b). Finalmente, la inyección de IL-4 indujo una leve disminución en la expresión de CD40L de superficie en las células V y MC, mientras que su efecto negativo sobre el CD40L total se observó solo en las células V y ME.

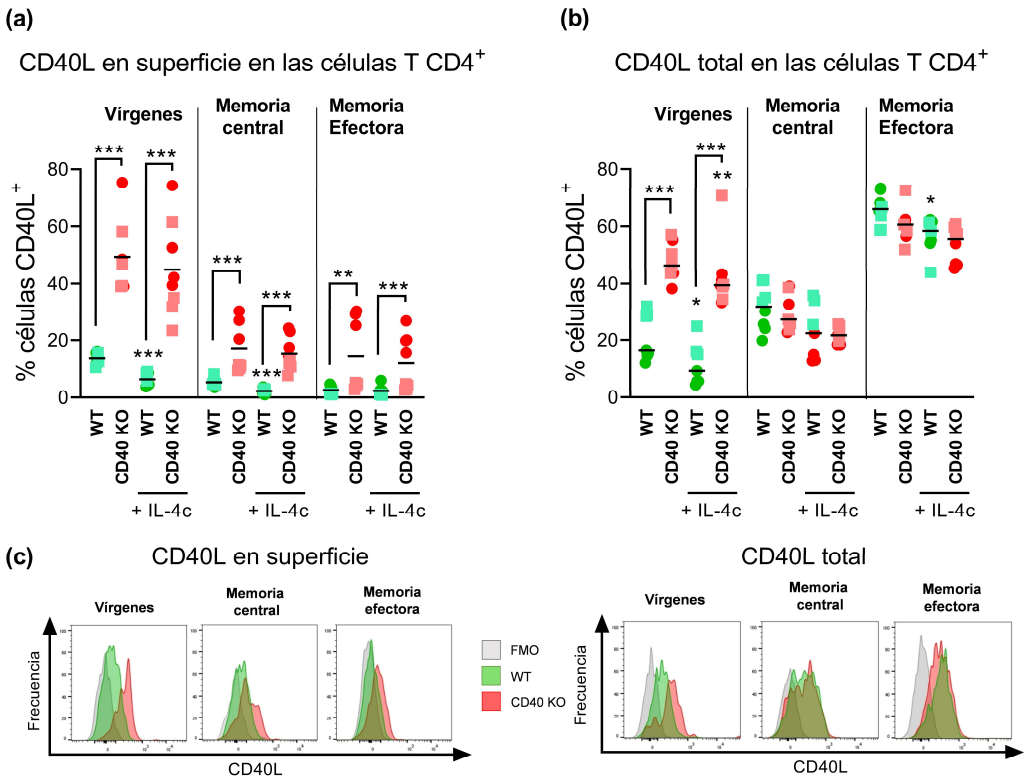


Figura 4.2.2. Las células T CD4⁺ V son las que más externalizan CD40L. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT o CD40 KO vía s.c con 1 µg de IL-4c o vehículo solamente. Luego de 48 horas se sometió a los animales a eutanasia y se cuantificó la expresión de CD40L en superficie (a) y total (b) en los distintos subtipos de células T CD4⁺ peritoneales (definidos como en la Figura 3.10 del capítulo de Materiales y Métodos) por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, e histogramas representativos solamente para las condiciones en ausencia de IL-4c (c). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para WT y de rojo para CD40 KO). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

4.2.2 El CD40L endógeno interactúa con el CD40 de los macrófagos de la CP en ausencia de interacciones específicas

La regulación del CD40L de superficie por CD40 ha sido descrita en el bazo, donde depende tanto del CD40 presente en células B como en células no B, mientras que en los ganglios linfáticos es casi exclusivamente dependiente de células no B (220). Por lo tanto, los macrófagos podrían ser candidatos para regular la expresión de CD40L en la superficie de las células T $CD4^+$ de la CP. Además, la regulación de CD40L a través de CD40 en los macrófagos sugeriría una posible interacción entre ambos tipos celulares, abriendo la posibilidad de que el CD40L actúe como una señal tónica para los macrófagos peritoneales en condiciones basales.

Para evaluar si los macrófagos pueden regular *in vivo* la expresión de CD40L en la superficie de las células T $CD4^+$ V (las cuales, como se describió anteriormente, son las más sensibles a la regulación por CD40), el experimento obvio sería transferir macrófagos de la CP de ratones WT o CD40 KO a la CP de ratones CD40 KO y analizar la expresión de CD40L. Sin embargo, como se detallará más adelante en la Sección 4, la CP de los ratones CD40 KO presentan muy pocas células T $CD4^+$ V, lo que dificultaría la interpretación de los resultados.

Por esta razón, se llevó a cabo un experimento de doble transferencia, en el cual se transfirieron macrófagos purificados obtenidos de la CP de ratones WT o CD40 KO a la CP de ratones CD40 KO que, previamente, habían recibido células T $CD4^+$ del bazo de un animal CD40 KO (Figura 4.2.3). Estas células T $CD4^+$ del bazo son mayoritariamente de fenotipo V y expresan altos niveles de CD40L en su superficie (Figura 4.2.4), lo que las convierte en un blanco adecuado para estudiar la regulación mediada por CD40.

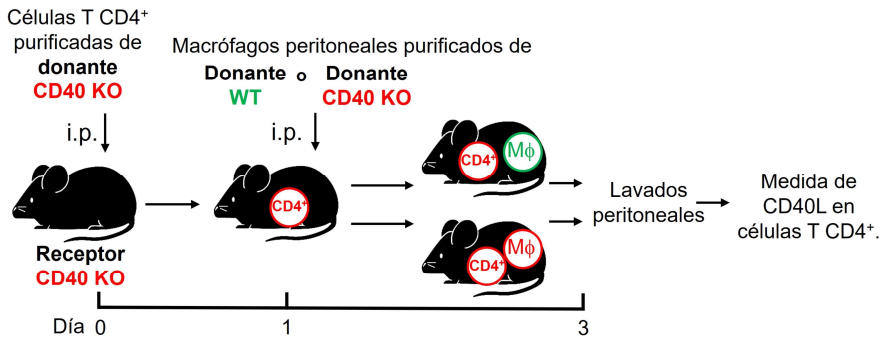


Figura 4.2.3. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.3 Diagrama de los experimentos de doble transferencia de células. Se purificaron células T CD4$^+$ a partir del bazo de un animal CD40 KO. A continuación, se transfirieron 1.5 x 10^5 células T CD4$^+$ purificadas por ratón a la CP de ratones receptores CD40 KO. Al día siguiente, se purificaron macrófagos de animales C57BL/6 WT o CD40 KO y se transfirieron 2 x 10^5 macrófagos de cada genotipo a la CP de los mismos ratones que previamente habían recibido las células T CD4$^+$. Se agregó además un grupo control al que no se le transfirieron macrófagos. Pasadas 48 horas de la transferencia de macrófagos o control, los animales se sometieron a eutanasia y se realizaron lavados peritoneales para el análisis de las células T CD4$^+$ por citometría de flujo. Se realizaron dos experimentos independientes.

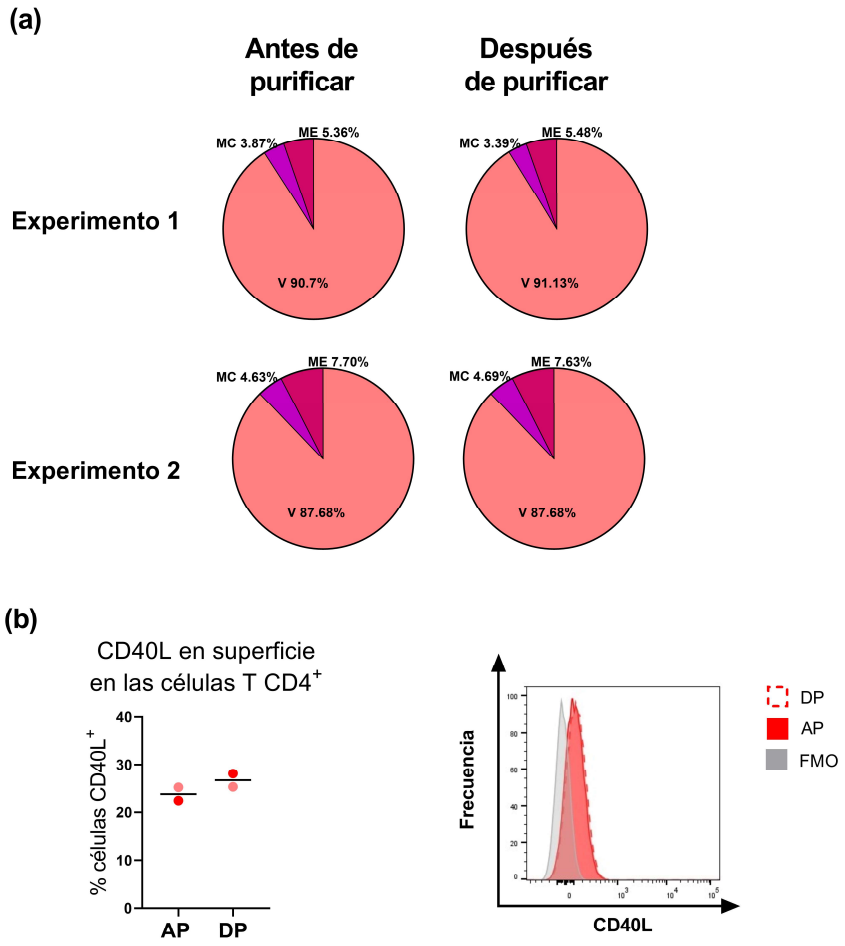


Figura 4.2.4. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.4. Las células T CD4⁺ purificadas del bazo de animales CD40 KO son mayoritariamente vírgenes y expresan CD40L de superficie. Se obtuvieron muestras de bazo de animales CD40 KO y se purificaron las células T CD4⁺ utilizando anticuerpos inmovilizados. Se determinó la fracción de células T CD4⁺ con fenotipo virgen ("V"), de memoria central ("MC") y de memoria efectora ("ME"), por citometría de flujo en base a expresión de CD62L y CD44, antes y después del proceso de purificación (a). Se verificó además que las células T CD4⁺ expresaran CD40L en su superficie tanto antes de purificar (AP) como después de purificar (DP) (b). Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, e histogramas representativos para cada condición. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas tonalidades de rojo en la gráfica de la izquierda).

Se evaluó la presencia de células T CD4⁺ en la CP de los ratones transferidos y, como se muestra en la Figura 4.2.5, los grupos que recibieron estas células presentaron, como se esperaba, una mayor cantidad de células T CD4⁺ V, en comparación al grupo que no recibió células del bazo CD40 KO.

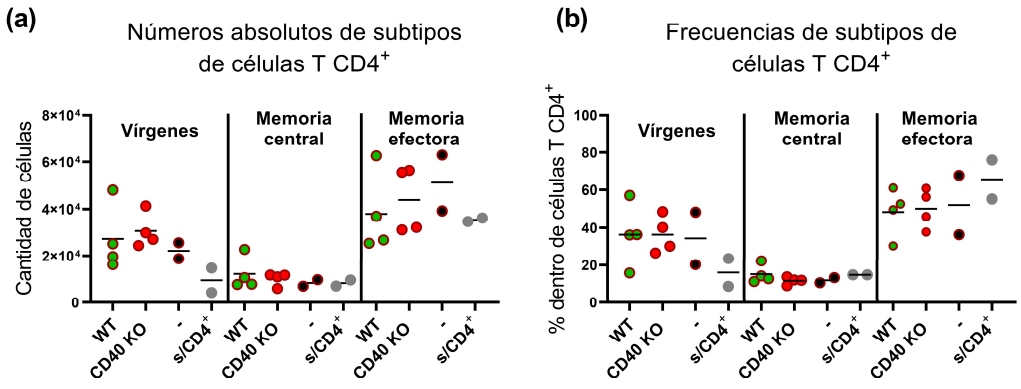


Figura 4.2.5. Luego de la transferencia de células T CD4⁺ purificadas se detectan más células T CD4⁺ V en la CP de los ratones receptores. Se transfirieron células T CD4⁺ del bazo de un ratón CD40 KO, y macrófagos de ratones WT o CD40 KO, o vehículo solamente, como se describe en la Figura 4.2.3. En uno de los experimentos se incluyó además un grupo control que no recibió ni células T CD4⁺ ni macrófagos, y en su lugar recibió vehículo solamente ("s/CD4⁺"). Pasadas 48 horas luego de la última transferencia, los animales se sometieron a eutanasia y se analizó la presencia de células T CD4⁺ V, MC y ME en la CP. Se muestran los resultados en números absolutos (a) o porcentajes dentro del total de células T CD4⁺ (b). Los datos corresponden a un experimento, y cada punto corresponde a un ratón (en verde para los animales que recibieron macrófagos de WT, en rojo para los que recibieron macrófagos de CD40 KO, en negro para los que recibieron vehículo, y en gris para los que además de no recibir macrófagos tampoco recibieron células T CD4⁺). Los bordes en tonalidades de rojo indican que los animales receptores, así como las células T CD4⁺ previamente transferidas, son CD40 KO.

Además, se verificó la presencia de CD40 en los macrófagos de las muestras de los donantes (Figura 4.2.6a), así como luego de la transferencia, en la totalidad de los macrófagos recuperados de los receptores (Figura 4.2.6b), como indicio de la eficiencia del procedimiento. Como se observa en la Figura 4.2.6b, solo aproximadamente el 2 % de los macrófagos de la CP en los ratones CD40 KO que recibieron macrófagos WT eran $CD40^{+/+}$.

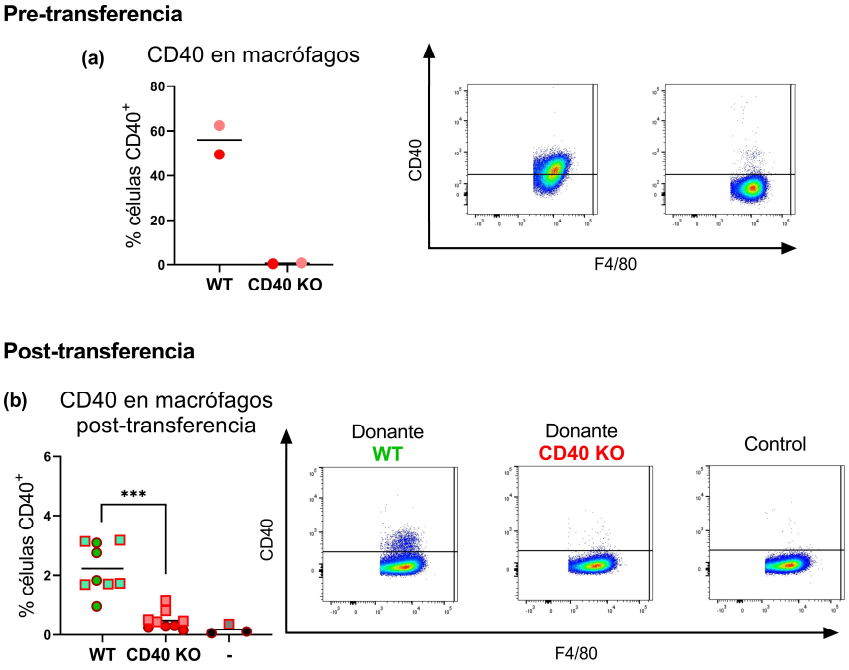


Figura 4.2.6. En la CP de los ratones CD40 KO transferidos con macrófagos WT se detectan una pequeña fracción de macrófagos $CD40^{+}$. A partir de *pooles* de muestras de CP de ratones C57BL/6 WT o CD40 KO (4 individuos por genotipo), se purificaron macrófagos y se determinó la expresión de CD40 por citometría de flujo (a). A continuación, se inyectaron 2 x 10^5 macrófagos purificados de ratones WT o de CD40 KO, o vehículo solamente, en la CP de ratones CD40 KO (que previamente habían recibido células T $CD4^{+}$ del bazo de animales CD40 KO). Luego de 48 horas, los animales se sometieron a eutanasia y se analizó la presencia de macrófagos $CD40^{+}$ en la CP (b). Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para los animales que recibieron macrófagos de WT, de rojo para los que recibieron macrófagos de CD40 KO, y de negro para los que recibieron vehículo solamente). Cada punto corresponde a un ratón, y los bordes en tonalidades de rojo indican que los ratones receptores, así como las células T $CD4^{+}$ previamente transferidas, son CD40 KO. En (b) el análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos, solamente sobre los datos de los ratones que recibieron macrófagos.

A pesar de la baja proporción de macrófagos WT detectados en la CP de los ratones receptores, estas células fueron suficientes para inducir una reducción significativa en la expresión de CD40L en la superficie de las células T CD4⁺ V, en comparación con las células T CD4⁺ V de los ratones que recibieron macrófagos KO para CD40 (Figura 4.2.7a). Además, se observó un efecto similar en las células T CD4⁺ ME, tanto para el CD40L en superficie como total (Figura 4.2.7). Los datos de CD40L en superficie celular expresados en términos de media geométrica de intensidad de fluorescencia (Geo-MFI) también mostraron diferencias significativas, solamente para las células T CD4⁺ V ($p < 0,05$) entre los ratones transferidos con macrófagos WT y CD40 KO (datos no mostrados).

Por lo tanto, el CD40 expresado en los macrófagos de la CP puede interaccionar con, y regular, el CD40L constitutivo de las células T CD4⁺.

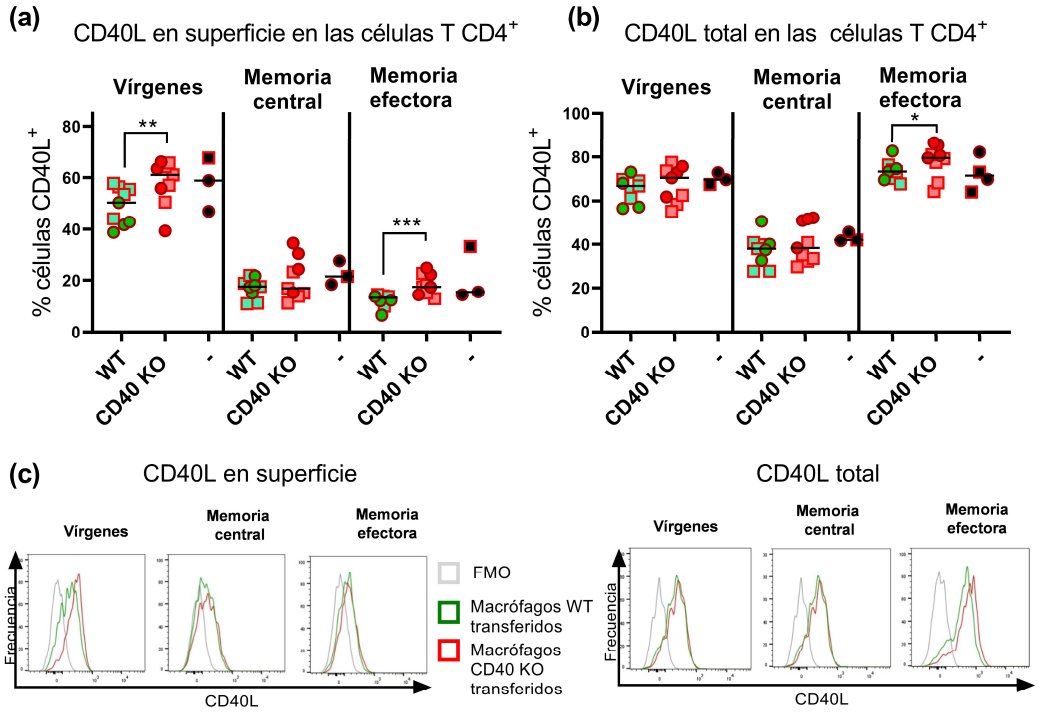


Figura 4.2.7. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.7. El CD40 de los macrófagos peritoneales regula la expresión de CD40L de superficie en las células T CD4⁺ *in vivo*. Se transfirieron células T CD4⁺ del bazo de un ratón CD40 KO y macrófagos de ratones WT o CD40 KO, o vehículo solamente, a la CP de ratones CD40 KO como se describe en la Figura 4.2.3, y se determinó la expresión de CD40L de superficie (a) y total (b) en los distintos subtipos de células T CD4⁺ de la CP. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como histogramas representativos para cada condición (c). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos de CD40L en superficie celular en las células T CD4⁺ de fenotipo virgen expresados en términos de Geo-MFI también mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los ratones transferidos con macrófagos WT y CD40 KO. Se muestran datos de dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para los animales que recibieron macrófagos de WT, de rojo para los que recibieron macrófagos de CD40 KO, y de negro para los que recibieron vehículo solamente). Cada punto corresponde a un ratón, y los bordes en tonalidades de rojo indican que los receptores, así como las células T CD4⁺ previamente transferidas, son CD40 KO. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos, solamente sobre los datos de los ratones que recibieron macrófagos.

4.2.3 El bloqueo de CD40L *in vivo* no tiene efectos sobre las respuestas de los macrófagos de la CP a la IL-4 exógena en condiciones basales

Una vez confirmadas las interacciones *in vivo* entre CD40 de macrófagos y CD40L de células T CD4⁺ en la CP en contexto basal, se evaluó si el CD40L endógeno influye en la respuesta de los macrófagos a la IL-4 mediante una primera estrategia de bloqueo. Se inyectaron ratones vía i.p. con IL-4c y el anticuerpo bloqueante de CD40L (MR1) o control, y a las 48 horas se evaluó mediante ELISA la producción de los marcadores RELM-α e Ym1 en la CP. Como se observa en la Figura 4.2.8, el bloqueo de CD40L no tuvo impacto sobre la polarización M(IL-4) de los macrófagos de la CP.

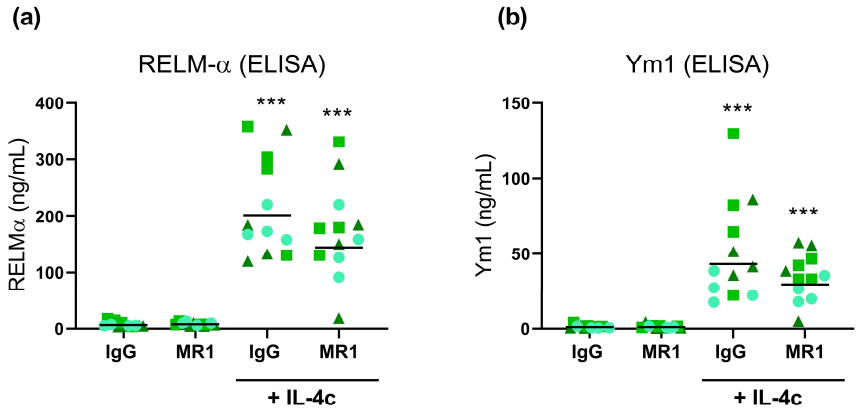


Figura 4.2.8. El bloqueo del CD40L endógeno no afecta la polarización M(IL-4) de los macrófagos de CP. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con IL-4c junto con el anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1") o anticuerpo control ("IgG"). Luego de 48 horas, se sometió a los animales a eutanasia y se midió la producción de RELM-α (a) e Ym1 (b) en el fluido del primer mililitro de lavado peritoneal por ELISA. Se muestran datos de tres experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde) y el valor promedio general. Cada punto corresponde a un ratón. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Para el mismo se realizó la transformación logarítmica de los datos y se realizó un test paramétrico de dos vías. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

Como se ha señalado anteriormente, la IL-4 administrada *in vivo* además de polarizar a los macrófagos, induce su proliferación en todos los sitios anatómicos analizados, incluida la CP. Por lo tanto, se evaluaron los números absolutos de LPM, SPM y células B, y como se muestra en la Figura 4.2.9a, los LPM respondieron a la IL-4 con un leve aumento en su número, a diferencia de los SPM y las células B. Si bien el aumento en número de LPM en respuesta a IL-4 no fue significativo en los animales que recibieron el anticuerpo bloqueante, no existió un efecto significativo de dicho anticuerpo cuando se lo comparó con el anticuerpo control. Asimismo, se analizó la proliferación celular mediante la expresión de Ki-67 y la incorporación de los análogos de precursores de ADN BrdU o EdU (Figura 4.2.9b-d). En los ratones inyectados con IL-4, se observaron aumentos de estos marcadores en los LPM y SPM, sin diferencias entre aquellos que recibieron MR1 o el control. En las células B no se observaron diferencias en los marcadores de proliferación.

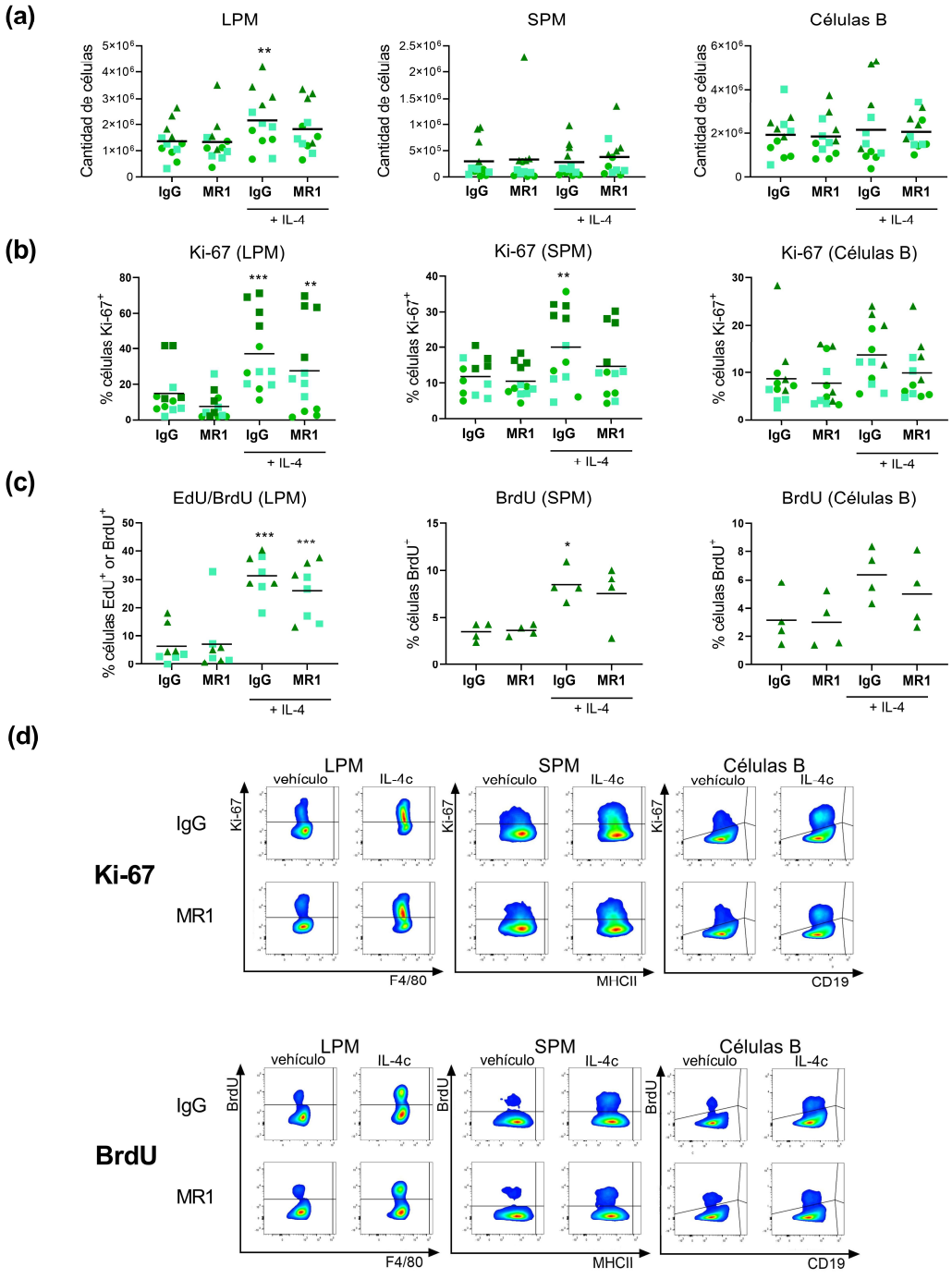


Figura 4.2.9. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.9. El bloqueo del CD40L endógeno no afecta la proliferación de los macrófagos de CP en respuesta a IL-4. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con IL-4c junto con el anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1") o anticuerpo control ("IgG"). Luego de 48 h se analizaron los números absolutos (a) y la proliferación de las células de la CP (definidas como en la Figura 3.4 del capítulo de Materiales y Métodos) por la expresión de Ki-67 (b) o incorporación de EdU o BrdU (c) mediante citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición (d). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a 1- 3 experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos cuando se realizó más de un experimento, y un ANOVA de una vía paramétrico cuando no. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

También se evaluó la posibilidad de que el CD40L endógeno tenga efectos sobre el fenotipo de los macrófagos en ausencia de IL-4. Para ello, se midió la expresión de MHCII en LPM y SPM, considerando que este marcador es fuertemente inducido en macrófagos por agonistas exógenos de CD40 (ver Sección 5 del capítulo de Resultados). Como se muestra en la Figura 4.2.10, la expresión basal de MHCII en los macrófagos de la CP no presentó cambios en presencia del MR1.

Por lo tanto, el CD40L endógeno en ausencia de interacciones específicas no influye sobre la polarización ni proliferación de los macrófagos de CP en respuesta a la IL-4 exógena *in vivo*, ni en la expresión basal de MHCII por estas células.

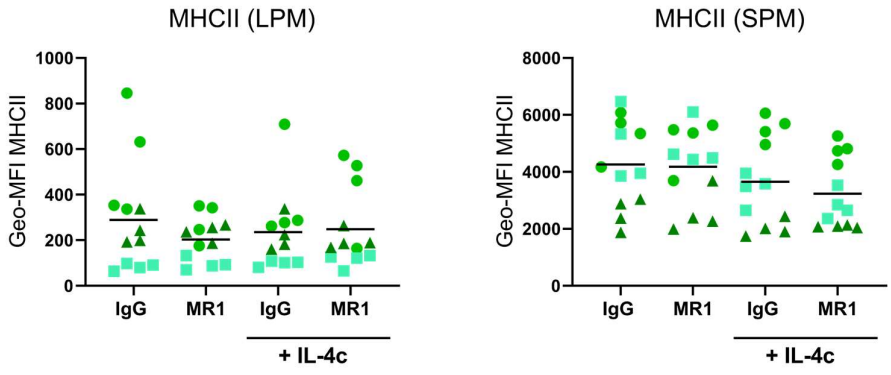


Figura 4.2.10. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.10. El bloqueo del CD40L endógeno no afecta la expresión basal de MHCII en los macrófagos de CP. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con IL-4c junto con el anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1") o anticuerpo control ("IgG"). Luego de 48 horas, se analizó la expresión de MHCII en LPM y SPM por citometría de flujo. Se muestran datos de tres experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde) y el valor promedio general, en términos de media geométrica de fluorescencia (Geo-MFI). Cada punto representa el dato de un ratón. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

4.2.4 El bloqueo de CD40L *in vivo* no tiene efectos sobre las respuestas de las células de Kupffer a la IL-4 exógena

Aunque el enfoque principal de este trabajo son los macrófagos de la CP, también se exploró el posible papel del CD40L en la proliferación de las KC en respuesta a la IL-4. Como se ha descrito previamente, estas células se localizan en el lumen de los sinusoides hepáticos y establecen interacciones directas con las células T $CD4^+$ circulantes en la sangre (272). Además, se ha observado que las células T $CD4^+$ de sangre tienen CD40L de superficie, en mayor nivel que las de tejidos linfoides (220). Con base en esto, se planteó la posibilidad de que las células T $CD4^+$, específicamente las T $CD4^+$ V circulantes, pudieran proporcionar CD40L, el cual podría tener efecto en la proliferación de las células de Kupffer.

Para abordar este objetivo, se inyectaron ratones por vía i.p. con IL-4c junto con el anticuerpo MR1 o el anticuerpo control, y luego de 48 horas, se les sacrificó para obtener la fracción no parenquimal hepática. Como se muestra en la Figura 4.2.11, en presencia de IL-4 se observó un aumento en los números absolutos de KC recuperadas por gramo de tejido hepático extraído, acompañado de un incremento en la proliferación de KC evidenciado por un aumento la expresión de Ki-67 y la incorporación de BrdU. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los animales inyectados con MR1 y los que recibieron el anticuerpo control.

En cuanto a la polarización M(IL-4) de las KC, no se detectó expresión de RELM-α por citometría de flujo luego de inyección de IL-4c (datos no mostrados).

En resumen, el CD40L endógeno no influye en la proliferación de las KC en respuesta a la IL-4 exógena.

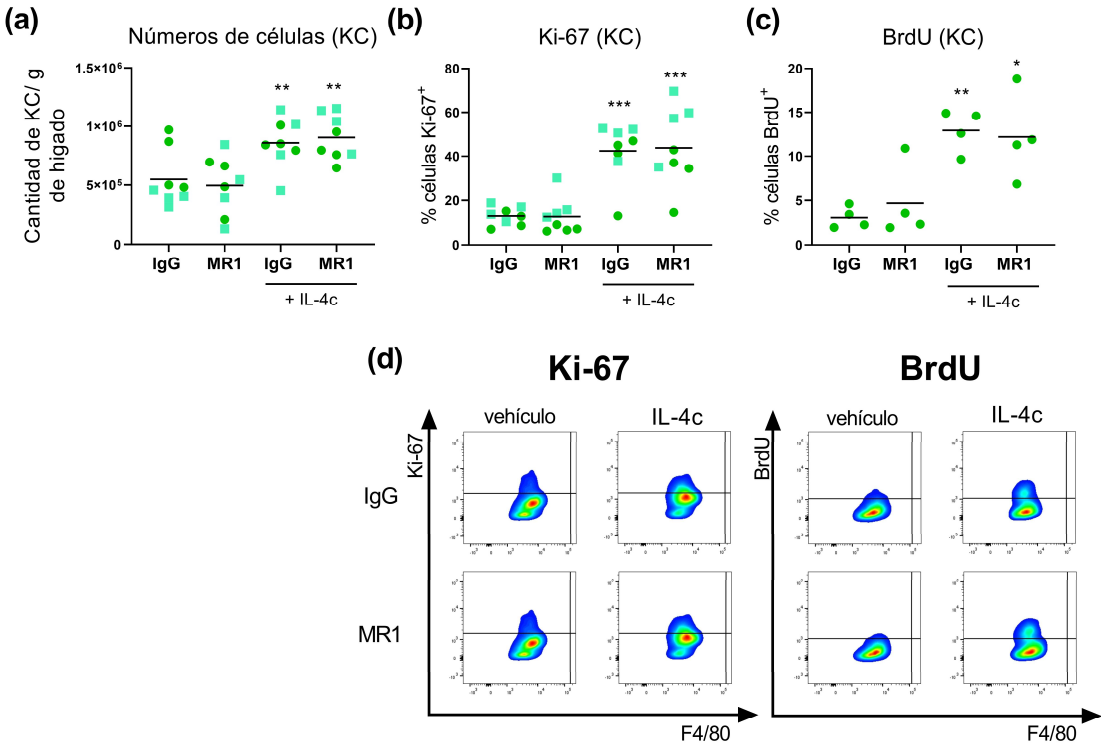


Figura 4.2.11. El bloqueo del CD40L no modifica la proliferación de las células de Kupffer en respuesta a IL-4. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con IL-4c junto con el anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1") o anticuerpo control ("IgG"). Luego de 48 horas, se obtuvo muestras de hígado, que fueron procesadas para obtener la fracción celular no parenquimal. A continuación, se analizó el número total de células de Kupffer (KC) presentes por gramo de hígado extraído (a), así como su proliferación por expresión de Ki-67 (b) e incorporación de BrdU (c), mediante citometría de flujo, utilizando la estrategia de definiciones celulares descrita en la Figura 3.5 del capítulo de Materiales y Métodos. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición (d). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a 1-2 experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos cuando se realizó más de un experimento, y un test ANOVA de una vía cuando no. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

4.2.5 La expresión de RELM-α e Ym1 inducida por la IL-4 exógena está potenciada en los macrófagos de ratones CD40 KO, mientras que los niveles de proliferación son normales

Dado que la estrategia de bloqueo del CD40L *in vivo* con anticuerpos podría tener problemas tales como bloqueo incompleto, efectos a través de la región Fc de los anticuerpos, o limitaciones asociadas con la corta duración del tratamiento, se decidió evaluar el impacto de la IL-4 sobre los macrófagos en ratones KO para CD40. Por lo tanto, se inyectaron ratones WT o CD40 KO vía s.c con IL-4c y a las 48 horas se midió la expresión de RELM-α e Ym1 en los macrófagos de la CP. Como se muestra en la Figura 4.2.12, los LPM de ratones CD40 KO presentaron una modesta pero significativa potenciación, en comparación con los ratones WT, en la expresión de RELM-α inducida por IL-4. Se observó un efecto similar para Ym1, en forma aún más débil que para RELM-α. Además, la conocida expresión basal de RELM-α de los SPM (135) fue significativamente mayor en los macrófagos de ratones CD40 KO en comparación con los WT, sin existir diferencia análoga en presencia de IL-4.

Por otro lado, la IL-4c no indujo un aumento en los números de LPM y SPM en macrófagos WT, a diferencia de lo observado en los experimentos de bloqueo; sin embargo, se observó un aumento en los LPM en respuesta a la IL-4c, únicamente en los CD40 KO. En contraste con lo observado para los marcadores de polarización M(IL-4), la proliferación en respuesta a la IL-4 fue normal tanto en los LPM como en los SPM de los ratones CD40 KO (Figura 4.2.13).

Asimismo, no se observaron diferencias entre los genotipos en la expresión basal de MHCII en LPM y SPM, tanto en ausencia como en presencia de IL-4 (Figura 4.2.14).

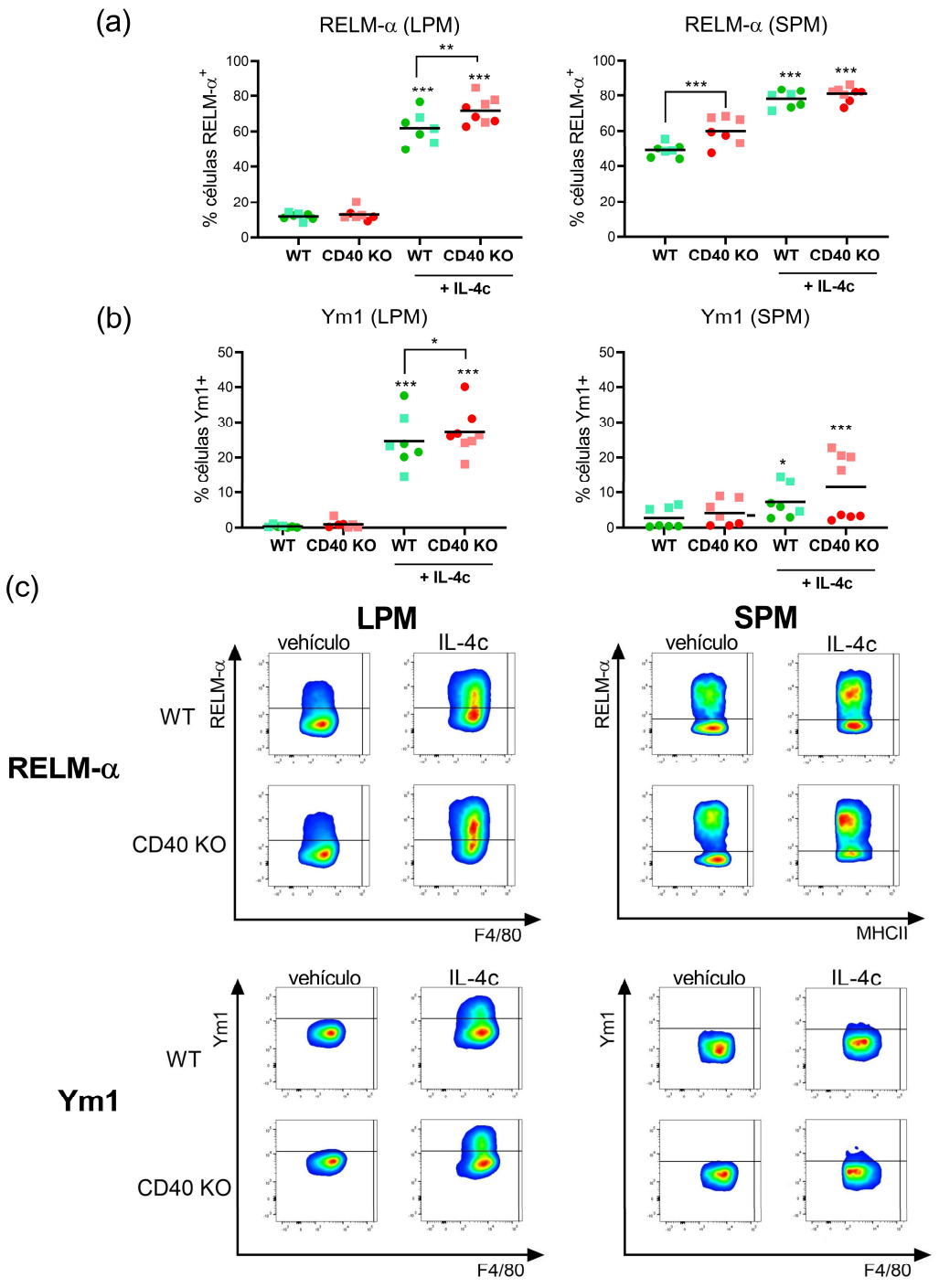


Figura 4.2.12. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.12. Los LPM de animales CD40 KO expresan niveles más altos de RELM-α y Ym1 en respuesta a la IL-4 que los de los animales WT. Se inyectaron animales C57BL/6 WT y CD40 KO vía s.c. con 1 µg de IL-4c, y a las 48 horas se sometió a los animales a eutanasia para el análisis de las células de la CP. Se analizó la expresión de RELM-α (a) e Ym1 (b) en los LPM y SPM por citometría de flujo utilizando la estrategia de definiciones celulares ilustrada en la Figura 3.4. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición (c). Los umbrales de detección fueron delimitados se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para WT y de rojo para CD40 KO). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

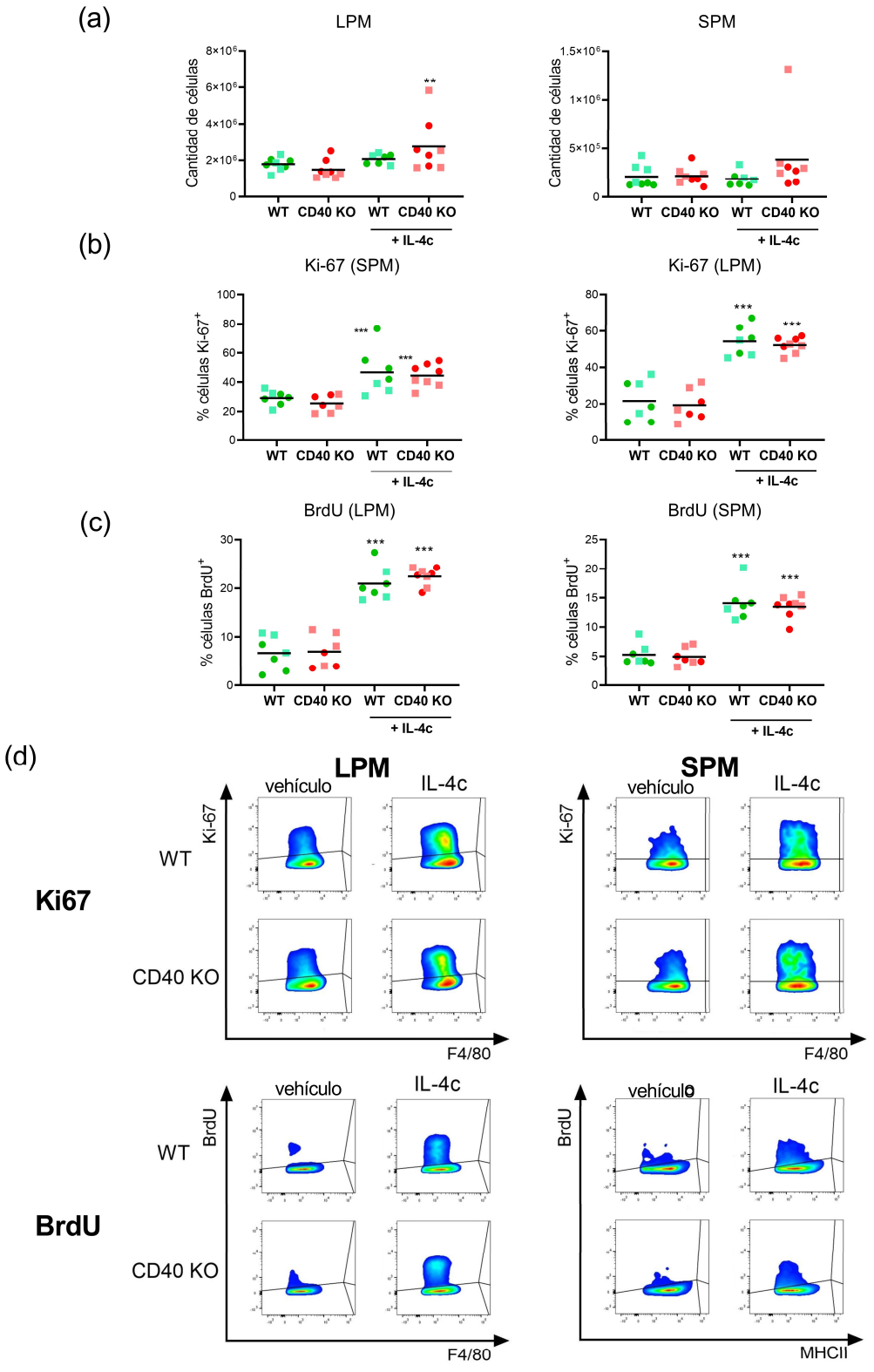


Figura 4.2.13. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.13. Los macrófagos de animales CD40 KO proliferan normalmente en respuesta a la IL-4. Se inyectaron animales C57BL/6 WT y CD40 KO vía s.c. con 1 µg de IL-4c, y a las 48 horas se sometió a los animales a eutanasia para el análisis de las células de la CP. Se analizaron los números de LPM y SPM (a), así como su proliferación por expresión de Ki-67 (b) e incorporación de BrdU (c), por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición (d). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para WT y de rojo para CD40 KO). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

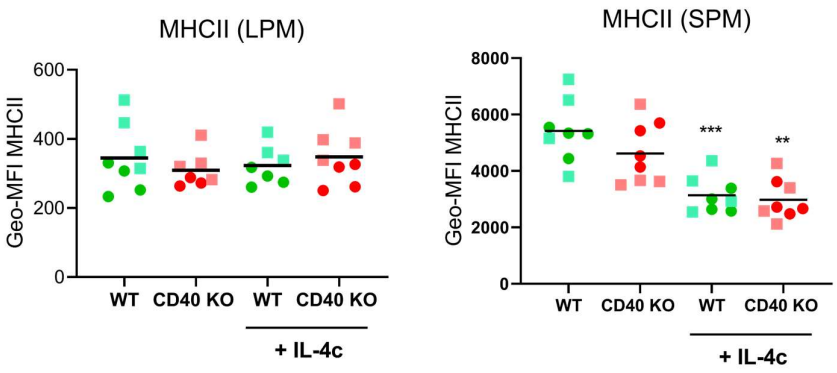


Figura 4.2.14. La ausencia de CD40 no modifica la expresión basal de MHCII en los macrófagos de CP. Se inyectaron animales C57BL/6 WT y CD40 KO vía s.c. con 1 µg de IL-4c y a las 48 horas se sometió a los animales a eutanasia para el análisis de MHCII en los macrófagos peritoneales por citometría de flujo. Se muestran datos de dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para WT y de rojo para CD40 KO) y el valor promedio general representados en media geométrica de fluorescencia (Geo-MFI). Cada punto representa el dato de un ratón. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

4.2.6 El efecto de la ausencia de CD40 sobre la expresión de RELM-α en los LPM no es autónomo de célula

Los resultados de los experimentos de bloqueo de CD40L (Fig. 4.2.8) y la comparación directa entre macrófagos WT y CD40 KO (Fig. 4.2.12) arrojaron

resultados en principio contradictorios en relación al impacto del CD40L endógeno en la polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales *in vivo*. La comparación de las respuestas de los macrófagos entre animales WT y CD40 KO no es del todo adecuada, dado que sus CP pueden presentar diferencias significativas en tipos celulares diferentes a los macrófagos. Esto de hecho incluye diferencias descritas en este trabajo, concretamente la ausencia de células T $CD4^+$ V en la CP de ratones CD40 KO (ver Sección 4 del capítulo de Resultados) y una mayor disponibilidad de CD40L en la CP de ratones CD40 KO, en comparación con la de ratones WT. Además, es concebible que en ratones CD40 KO, los macrófagos u otras células presentadoras de antígeno respondan a esos niveles aumentados de CD40L endógeno a través de receptores alternativos, cuya expresión a su vez también podría estar alterada. Por lo tanto, se utilizó la estrategia de transferencia de macrófagos WT o CD40 KO a la CP de ratones WT, de forma de minimizar las diferencias de contexto en el que se encuentran estas células, y poder realizar una comparación más precisa.

Para los experimentos de transferencia, fue necesario marcar los macrófagos de los animales donantes para su seguimiento en la CP de los receptores. El marcado se realizó utilizando la sonda PKH26-PCL, que es incorporada selectivamente por células fagocíticas. En primer lugar, se verificó que, ante un estímulo proliferante a corto plazo, no ocurriera una dilución de la marca lo suficientemente significativa como para perderla y generar confusión entre las células de donantes y receptores en los experimentos posteriores. Para ello se inyectaron ratones WT con PKH26-PCL y a las 24 horas se estimularon con IL-4c o CSF1-Fc, una versión recombinante de M-CSF de cerdo que es activa *in vivo* en ratones (267), o se les inyectó con PBS solamente. Luego de 48 horas, se evaluó la presencia de la sonda en los LPM y SPM. Como se muestra en la Figura 4.2.15a, no se observó un desplazamiento hacia menores intensidades de fluorescencia de PKH26-PCL en los ratones que recibieron IL-4c o CSF-1 en comparación con los controles que recibieron solo la sonda, para los LPM ni SPM. Esto se observó a pesar de que los LPM presentaron un aumento significativo en el número de células en la condición con IL-4c respecto al control, tanto en presencia como ausencia de la sonda (Figura 4.2.15b). Probablemente, el hecho de no observar una disminución en la marca de la sonda se deba a que ésta se encontraba en exceso, y el intervalo de tiempo entre la administración de los estímulos y el análisis no fue lo suficientemente largo como para permitir un número de divisiones celulares que hiciera visible su dilución. Por otro lado, como se mencionó previamente en el capítulo de Materiales y Métodos, en los SPM no se observa un marcado total de las células ya que la definición simplificada utilizada incluye también DC que, al no ser fuertemente fagocíticas, no adquieren la sonda y se visualizan como negativas para la misma. Además, para los SPM se observa un comportamiento bimodal del marcado de la sonda mientas que

para los LPM no. Una posible explicación para esto podría ser que, debido a su mayor tamaño, los LPM presenten niveles más altos de autofluorescencia que los SPM, ya que generalmente el aumento del tamaño celular se asocia con este fenómeno. Como resultado, la autofluorescencia de los LPM podría solaparse con la señal de la sonda, lo que daría lugar a un perfil unimodal en su marcado, a diferencia de lo observado en los SPM.

Dado que el enfoque principal de este trabajo es la proliferación y polarización de los macrófagos, era fundamental además confirmar que la presencia de la sonda no interfería en estos procesos. Entonces, se midió además la proliferación de los macrófagos de la CP en base a la expresión de Ki-67 e incorporación de BrdU (Figura 4.2.15c-d), en respuesta a IL-4c o CSF1-Fc, para los LPM y los SPM de ratones que recibieron sonda, en comparación con las células de los animales que no recibieron sonda. Esta comparación confirmó que la sonda no interfiere en la proliferación de los LPM bajo ninguno de los estímulos utilizados. En los SPM, se observó que la presencia de la sonda potencia levemente la proliferación en respuesta a la IL-4c.

Se analizó también la influencia de la sonda sobre la polarización M(IL-4) de los macrófagos de la CP (Figura 4.2.16). No se observaron diferencias significativas entre las respuestas de los LPM y SPM animales que recibieron IL-4c en presencia o ausencia de la sonda.

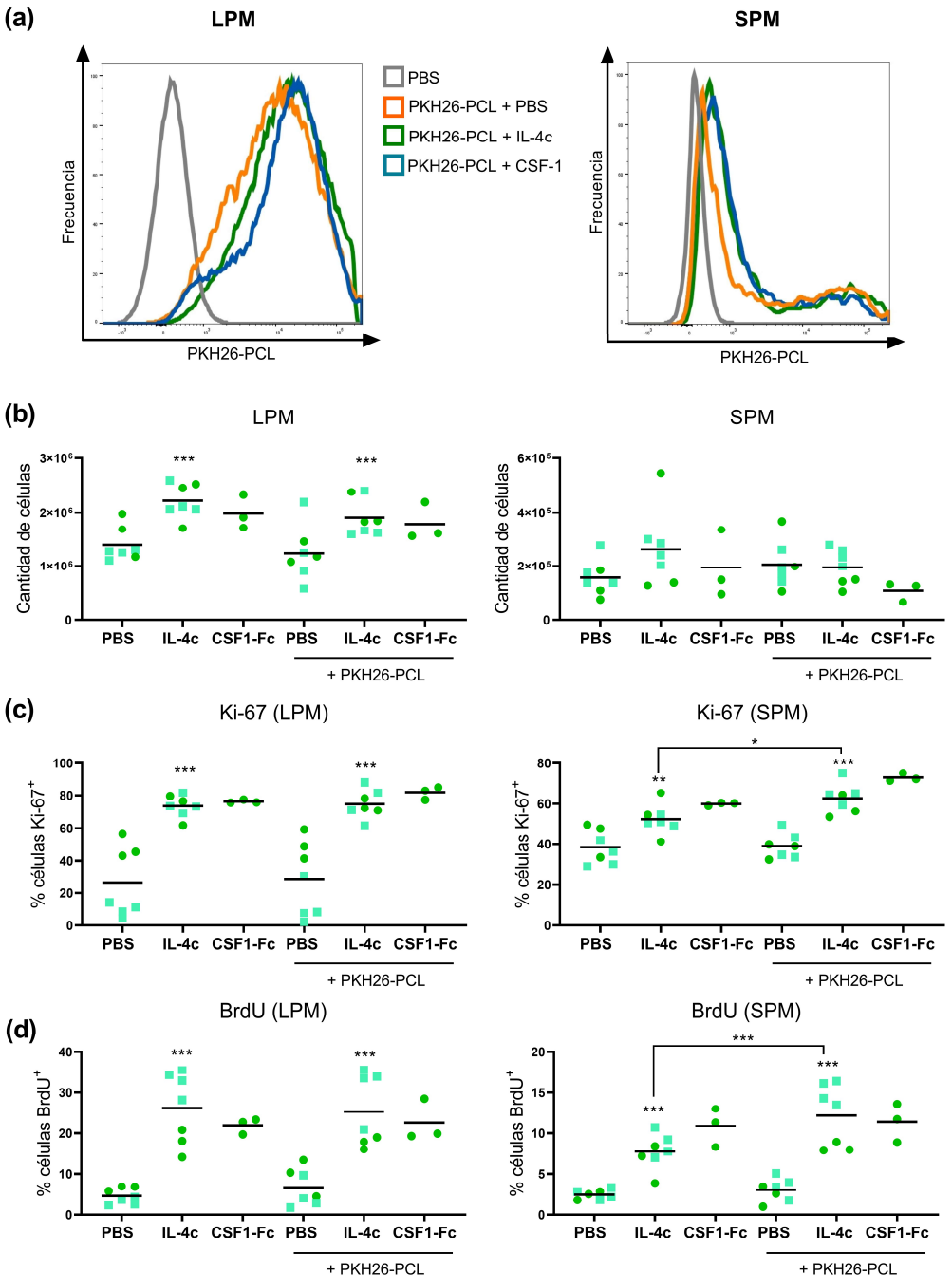


Figura 4.2.15. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.15. La sonda PKH26-PCL no interfiere con la proliferación de macrófagos de CP. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con 175 pmoles por ratón de PKH26-PCL o con PBS solamente. Luego de 24 horas, se inyectaron los mismos ratones vía s.c. con IL-4c, CSF-1-Fc o PBS. Pasadas 48 horas desde la última inyección, se sometió a los animales a eutanasia para el análisis de la proliferación de los macrófagos de CP. La sonda PKH26-PCL se detectó en los LPM y SPM por citometría de flujo, y se muestran histogramas representativos para las principales condiciones (a). Se midieron los números absolutos de LPM y SPM (b), así como la proliferación de ambas poblaciones mediante la expresión de Ki-67 (c) y la incorporación de BrdU (c). Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a 1-2 experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se aplicó a las condiciones "PBS" e "IL-4c" en presencia y ausencia de PKH26-PCL solamente. Se realizó el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

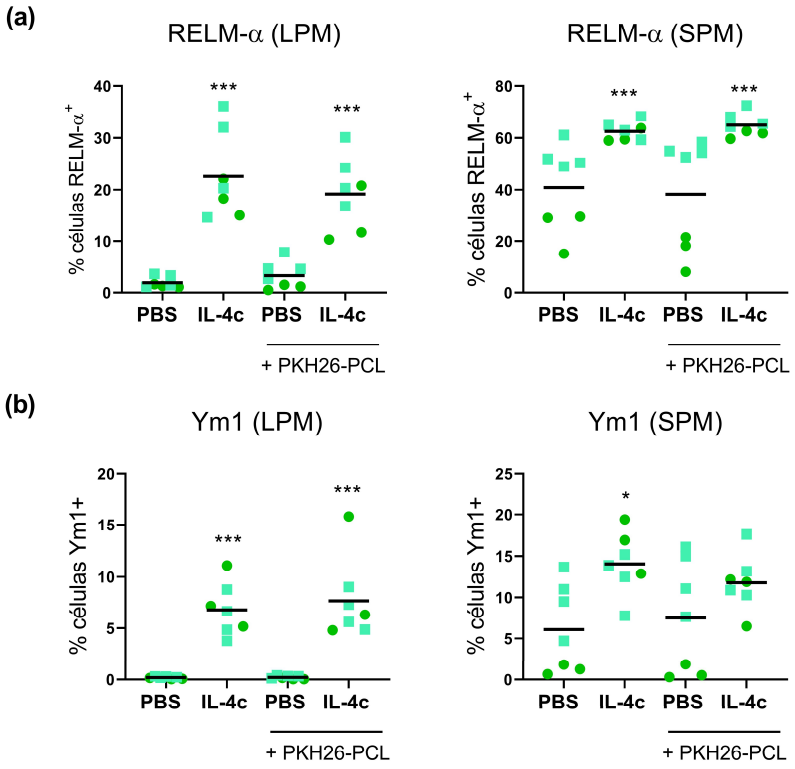


Figura 4.2.16. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.16. La sonda PKH26-PCL no modifica la polarización M(IL-4) de macrófagos de CP. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con 175 pmoles por ratón de PKH26- PCL o PBS. Luego de 24 horas se inyectaron los mismos ratones vía s.c. con IL-4c o PBS. Pasadas 48 horas desde la última inyección, se sometió a los animales a eutanasia para el análisis de la polarización de los macrófagos peritoneales. Se midió en los LPM y SPM la expresión de RELM-α (a) e Ym1 (b) por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

Una vez realizados los controles pertinentes para la sonda PKH26-PCL, se procedió a realizar los experimentos de transferencia de macrófagos. Para ello, se marcaron *in vivo* los macrófagos de ratones WT y CD40 KO, y después de 24 horas, las células totales de la CP o los macrófagos peritoneales purificados se transfirieron a la CP de ratones WT, según se detalla en la Figura 4.2.17. Una semana después de la transferencia, se inyectaron los ratones receptores con IL-4c, y 48 horas más tarde, se sacrificaron los animales para el análisis de las células de la CP.

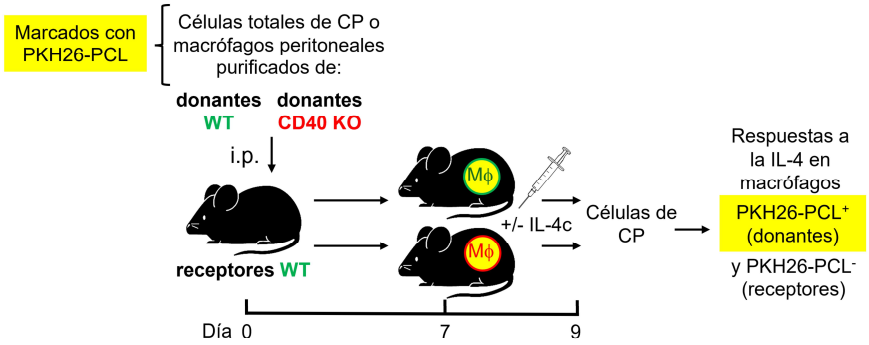


Figura 4.2.17. Diagrama de los experimentos de transferencia de macrófagos. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT o CD40 KO vía i.p. con 175 pmoles por ratón de PKH26-PCL. Luego de 24 horas, los animales se sometieron a eutanasia y se obtuvieron las células totales de la CP para transferir como tales, o se purificaron a partir de éstas los macrófagos utilizando anticuerpos inmovilizados. Se transfirieron 3 x 10^5 células totales de CP o 2 x 10^5 macrófagos purificados por ratón a la CP de ratones C57BL/6 WT. Una semana más tarde, se inyectaron los ratones con 1 µg de IL-4c por ratón o PBS solamente, y 48 horas después se les sometió a eutanasia para el estudio de las respuestas de los macrófagos de CP del donante (PKH26-PCL^+) y del receptor (PKH26-PCL^-) por citometría de flujo. Se realizaron dos experimentos independientes en los que se transfirieron células totales de CP, y dos experimentos transfiriendo macrófagos purificados.

En primer lugar, se calcularon las eficiencias de las transferencias de los macrófagos en base a la cantidad de células transferidas y las detectadas post-transferencia. Como se observa en la Figura 4.2.18 tanto para LPM como SPM las eficiencias promedio están en el rango 20-40 %, y no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales.

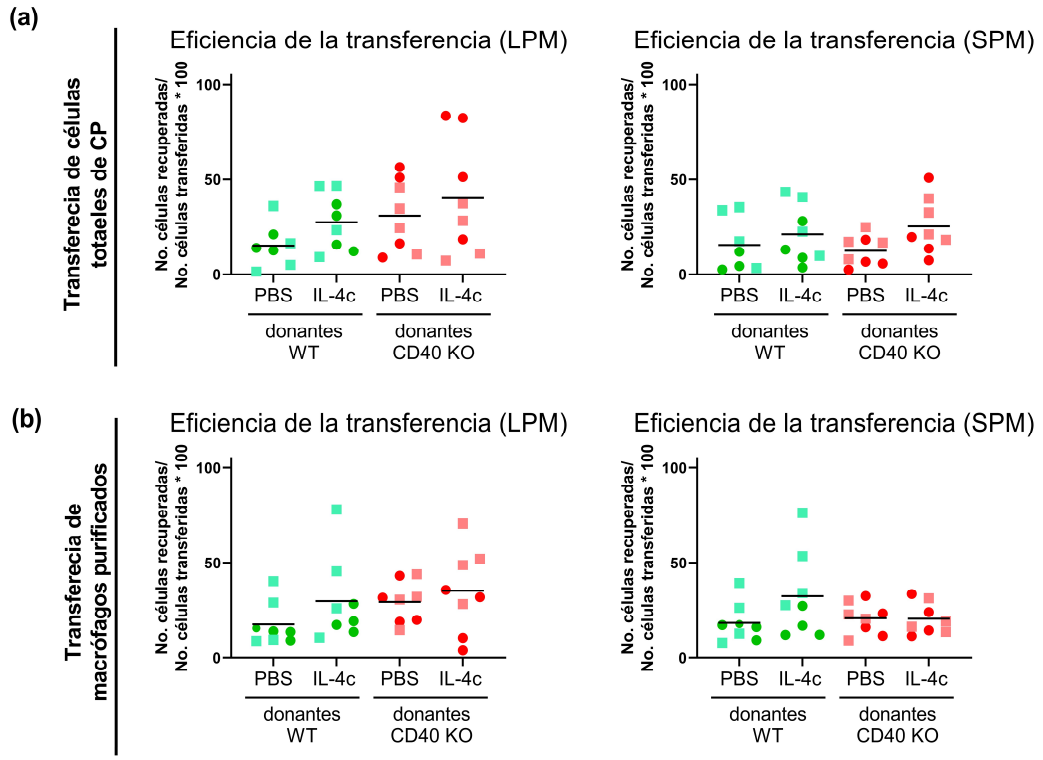


Figura 4.2.18. La eficiencia de la transferencia de macrófagos de la CP está entre 20 y 40 %, para LPM y SPM, independientemente del genotipo. Se transfirieron células marcadas con PKH26-PCL a la CP de ratones WT como se describe en la Figura 4.2.17. Se determinó en los LPM y SPM las poblaciones PKH26-PCL$^+$ (donante) y PKH26-PCL$^-$ (receptor) y se calcularon las eficiencias de las transferencias de células totales de CP (a) y de macrófagos purificados (b). Se muestran datos de dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para WT y de rojo para CD40 KO) y el valor promedio general. Cada punto representa los datos de ratones individuales. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos y no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales.

Posteriormente, se comparó la polarización M(IL-4) de los macrófagos de los donantes (PKH26-PCL$^+$) y receptores (PKH26-PCL$^-$) dentro de cada ratón. Como se ilustra en la Figura 4.2.19, la respuesta a la IL-4 de los LPM transferidos WT fue significativamente menor que la de los receptores (también WT) en términos de

expresión de Ym1, pero no de RELM-α. Esta diferencia se observó tanto en las transferencias de células totales de la CP como en aquellas con macrófagos purificados, lo que descarta que la purificación, o la ausencia de ella sea la causa del problema. Los SPM también mostraron diferencias en la respuesta a la IL-4 entre donantes WT y receptores WT, no solo para la expresión de Ym1, sino también para RELM-α. Sin embargo, la interpretación de los datos de SPM es compleja por la presencia de DC en los definidos SPM del receptor, pero no en los marcados por la sonda en el dador.

Finalmente, también se analizó la proliferación de los macrófagos transferidos y los del receptor (Figura 4.2.20). Se observó nuevamente que tanto los LPM como SPM de donantes WT responden más débilmente a la IL-4 que los macrófagos del receptor también WT, invalidando la comparación entre receptor y donante.

En suma, solo se pudo obtener datos confiables para la respuesta de los LPM en términos de expresión de RELM-α (Figura 4.2.19b), y no se observaron diferencias entre las respuestas de donantes CD40 KO y receptores WT dentro de cada ratón. Cabe destacar que la diferencia observada entre los LPM de donantes CD40 KO y donantes WT cuando se transfirieron macrófagos purificados fue acompañada por una diferencia similar entre los LPM de los respectivos receptores WT, lo que indica que no se trata de un efecto de CD40 autónomo de célula.

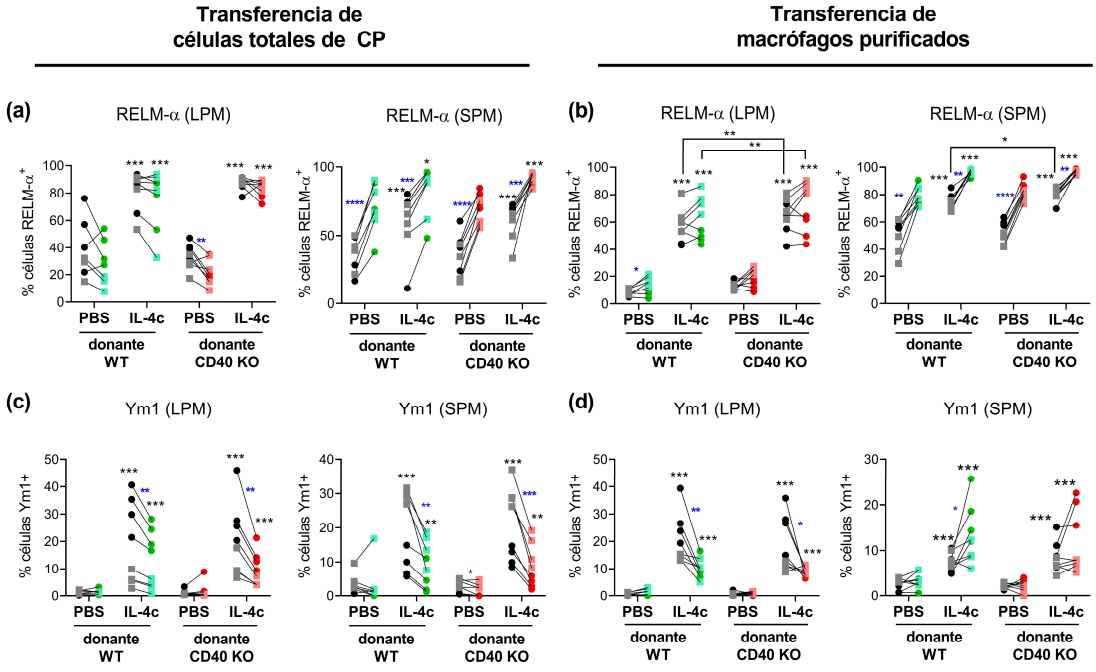


Figura 4.2.19. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.19. La ausencia de CD40 en los LPM no impacta en forma autónoma de célula sobre su expresión de RELM-α inducida por la IL-4. Se transfirieron células marcadas con PKH26-PCL a la CP de ratones WT C57BL/6 como se describe en la Figura 4.2.17. Se midió en los LPM y SPM de donante (PKH26-PCL^{+}) y del receptor (PKH26-PCL^{-}) la expresión de RELM-α (a y b) e Ym1 (c y d) por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Se presentan los datos apareados de las respuestas de LPM o SPM de donante y receptor obtenidos de un mismo ratón. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes de transferencia de células totales y otros tanto de transferencia de macrófagos purificados, mostrados en diferentes formas y tonalidades de verde para los donantes WT, en rojo para los donantes CD40 KO y en negro/gris para los receptores WT. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los datos apareados, correspondientes a las células de donantes y receptores dentro de cada ratón, se analizaron mediante un test-t apareado, y las diferencias se indican con asteriscos azules. Los asteriscos negros que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

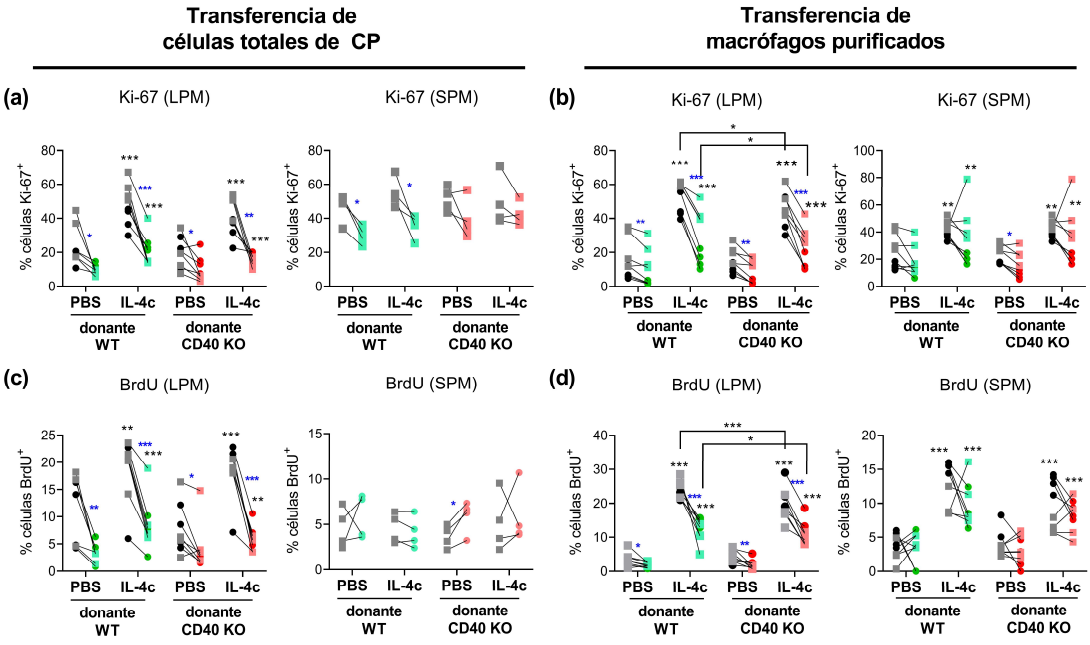


Figura 4.2.20. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.2.20. Los efectos negativos de la transferencia de células sobre la proliferación de macrófagos en respuesta a IL-4 impiden obtener un resultado sobre el impacto de la presencia de CD40 en los macrófagos. Se transfirieron células marcadas con PKH26-PCL a la CP de ratones WT C57BL/6 como se describe en la Figura 4.26. Se midió en los LPM y SPM de donante (PKH26-PCL^{+}) y del receptor (PKH26-PCL^{-}) la proliferación por expresión de Ki-67 (a y b) e incorporación de BrdU (c y d) por citometría de flujo). Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Se presentan los datos apareados de las respuestas de LPM o SPM de donante y receptor obtenidos de un mismo ratón. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes de transferencia de células totales y otros tanto de transferencia de macrófagos purificados, mostrados en diferentes formas y tonalidades de verde para los donantes WT, en rojo para los donantes CD40 KO y en negro/gris para los receptores WT. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los datos apareados, correspondientes a las células de donantes y receptores dentro de cada ratón, se analizaron mediante un test-t apareado y las diferencias se indican con asteriscos azules. Los asteriscos negros que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

4.3 Resultados 3: CD40L endógeno en contexto inflamatorio

4.3.1 Descriptiva del CD40L en un contexto inflamatorio

Para estudiar el papel del CD40L en un contexto inflamatorio, se utilizó un modelo de peritonitis aguda inducida mediante la inyección intraperitoneal de medio tioglicolato. Este medio, inyectado en ratones de forma intraperitoneal, provoca un fuerte reclutamiento de monocitos circulantes hacia la CP, donde posteriormente se diferencian en IMacs (273). En términos generales, los IMacs suelen poseer características transcripcionales, funcionales y fenotípicas distintas a las células residentes, incluso en sitios donde las células residentes normalmente son repuestas por monocitos (125,274). Por lo tanto, como primer paso, se midió la expresión de CD40 en los IMacs de ratones WT luego de 3 días de la inyección intraperitoneal de medio tioglicolato (tiempo suficiente para el reclutamiento de monocitos y su diferenciación a IMacs), y se la comparó con la de los LPM, que constituyen la población mayoritaria de macrófagos en la CP en condiciones basales. Como se observa en la Figura 4.3.1 los IMacs expresan niveles de CD40 significativamente más bajos que los LPM. Además, se cuantificó la expresión de CD40 en las células B, una población minoritaria en este contexto inflamatorio, y se observó que presentaban niveles levemente inferiores de CD40 en comparación con las células B de la CP basal.

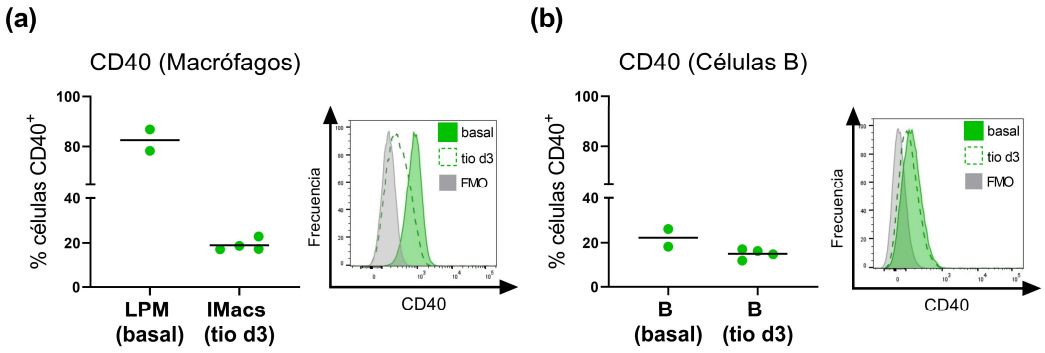


Figura 4.3.1. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.3.1. Los macrófagos y las células B en contexto inflamatorio expresan niveles de CD40 más bajos que los observados en contexto basal. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con 800 µL de medio tioglicolato 4% m/v y luego de 72 horas se sometió a los animales a eutanasia para el análisis de las células de la CP ("tio d3"); para comparación, se analizaron animales sin ninguna intervención ("basal"). Se determinó la expresión de CD40 en los macrófagos peritoneales mayoritarios para cada condición ("LPM" en contexto basal e "IMacs" en contexto inflamatorio) (a) y en las células B (b) de la CP por citometría de flujo utilizando las definiciones celulares descritas en la Figura 3.11 del capítulo de Materiales y Métodos. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, e histogramas representativos para cada condición. Los datos corresponden a un único experimento.

A continuación, se analizó la disponibilidad de CD40L en la CP en contexto inflamatorio. Para ello, 3 días después de la inyección de medio tioglicolato se cuantificó la expresión de CD40L de superficie y total en los distintos tipos de células presentes en la cavidad. Al igual que en la CP en contexto basal, se observó que exclusivamente las células T CD4⁺ expresan CD40L, mayoritariamente intracelular, pero también expuesto en su superficie celular (Figura 4.3.2). Además, se comparó la expresión de CD40L en células T CD4⁺ de la CP en contexto inflamatorio y en condiciones basales, observándose niveles similares de CD40L, tanto en superficie como total (Figura 4.3.2c-d).

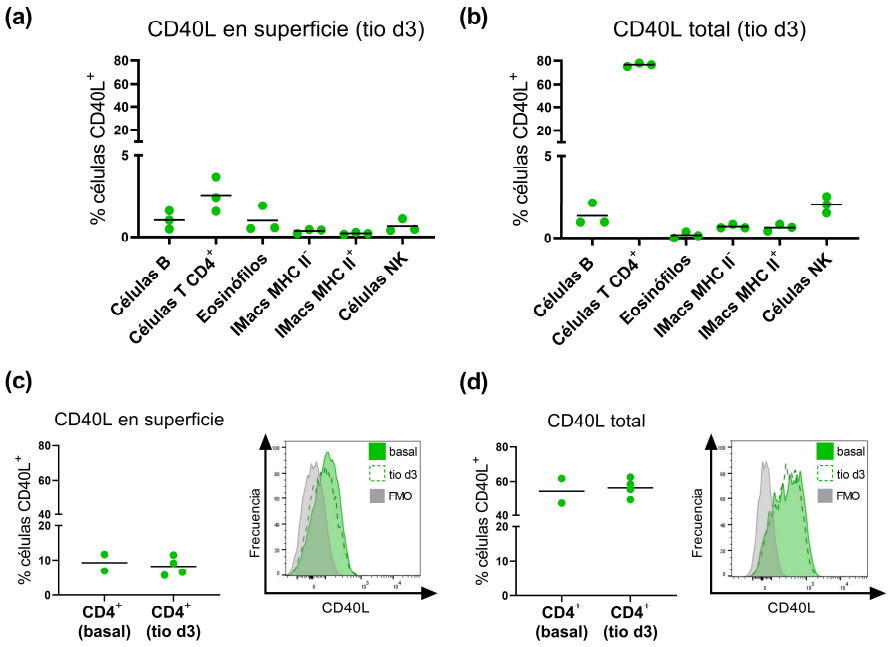


Figura 4.3.2. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.3.2. Las células T CD4$^+$ en contexto inflamatorio expresan niveles de CD40L endógeno similares a los observados en contexto basal. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con 800 µL de medio tioglicolato 4% m/v, y luego de 72 horas se sometió a los animales a eutanasia para el análisis de las células de la CP ("tio d3"). Se determinó la expresión de CD40L en superficie (a) y total (b) en los distintos tipos celulares presentes en la CP en el contexto inflamatorio (definidos como en la Figura 3.13 del capítulo de Materiales y Métodos), por citometría de flujo. Además, se evaluó la expresión de CD40L en superficie (c) y total (d) en las células T CD4$^+$ en el contexto inflamatorio en comparación con las células T CD4$^+$ en contexto basal (sin inyección de medio tioglicolato). Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, e histogramas representativos para cada condición. Los datos corresponden a un único experimento.

4.3.2 El bloqueo de CD40L *in vivo* no tiene efectos sobre las respuestas de los macrófagos de la CP a la IL-4 exógena en condiciones inflamatorias

Se evaluó si el CD40L endógeno afecta las respuestas de los IMacs *in vivo*. Para ello, se inyectaron ratones vía i.p. con medio tioglicolato y 3 días más tarde vía i.p. con IL-4c en conjunto con el anticuerpo MR1 o el anticuerpo control. A las 48 horas de las últimas inyecciones, se sacrificaron los ratones y se analizaron las poblaciones de IMacs, clasificados según su expresión de MHCII. Cabe aclarar que la población de IMacs MHCII$^-$, tal como ha sido definida (ver la Figura 3.6 del capítulo de Materiales y Métodos), está contaminada con DC y monocitos.

Como se observa en la Figura 4.3.3, los IMacs MHCII$^+$ respondieron a la IL-4 con un aumento en el número de células, así como un aumento de la proliferación en términos de expresión de Ki-67, mientras que los IMacs MHCII$^-$ no respondieron. No se observaron diferencias entre la proliferación de los IMacs MHCII$^+$ en presencia del anticuerpo MR1 en comparación al control.

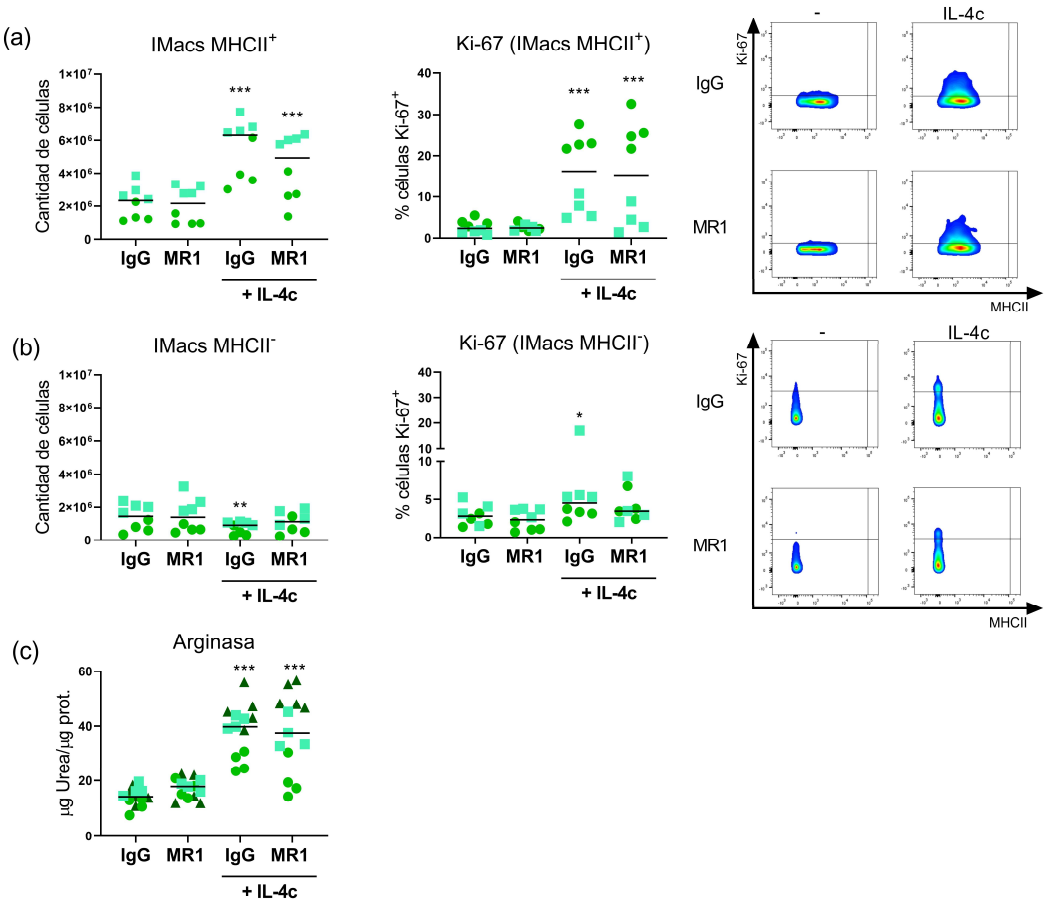


Figura 4.3.3. El bloqueo del CD40L en contexto inflamatorio no afecta la proliferación ni la inducción de Arginasa en los macrófagos peritoneales en respuesta a IL-4. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con 800 µL de medio tioglicolato 4% m/v. Luego de 72 horas se inyectaron los mismos ratones vía i.p. IL-4c o PBS como control de vehículo, junto con el anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1") o anticuerpo control ("IgG"). Luego de 48 h se analizaron mediante citometría de flujo los IMacs MHCII$^+$ (a) e IMacs MHCII$^-$ (b), utilizando las definiciones celulares ilustradas en la Figura 3.6 del capítulo de Materiales y Métodos, en términos de números absolutos y de expresión de Ki-67 como indicación de proliferación. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición. Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Además, se midió la actividad arginasa (c) en lisados de células totales de la CP como indicador de la diferenciación M(IL-4) de los IMacs; se muestran datos de ratones individuales y promedios correspondientes. Los datos corresponden a 2-3 experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde).El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

Por otro lado, como medida de la polarización M(IL-4) de los IMacs, se realizó la cuantificación de la actividad arginasa en lisados de células totales de la CP de los mismos ratones inyectados con IL-4c y MR1 o control. Como se muestra en la Figura 4.3.3c, la inyección de IL-4c potenció la actividad de la arginasa, pero no se observaron diferencias en presencia del anticuerpo MR1.

Por lo tanto, el CD40L endógeno presente en la CP en un contexto inflamatorio estéril no influye sobre las respuestas de los IMacs a la IL-4.

4.4 Resultados 4: Papel de CD40-CD40L en las poblaciones de la CP

4.4.1 En la CP de ratones CD40 KO hay menos células T CD4$^+$, particularmente vírgenes, que en la CP de los ratones los WT

Tal como se describió previamente, uno de los sistemas utilizados para estudiar el papel del CD40L endógeno en las respuestas de los macrófagos de la CP fue la comparación del efecto de la IL-4 *in vivo* entre ratones WT y CD40 KO. Durante estos experimentos, se observó que, de forma llamativa, los ratones CD40 KO presentaban casi 7 veces menos células T CD4$^+$ en la CP que los ratones WT (Figura 4.1.1). Asimismo, se detectó una reducción de aproximadamente 2.5 veces en la cantidad de células T CD8$^+$ respecto a los WT, sin que se observaran cambios en los demás tipos celulares analizados. Estos déficits no impactaron en la cantidad total de células recuperadas de la CP para cada genotipo, ya que, al tratarse de poblaciones minoritarias, no repercuten significativamente en los números totales de células, sin evidenciarse aumentos compensatorios en las abundancias de otros tipos celulares.

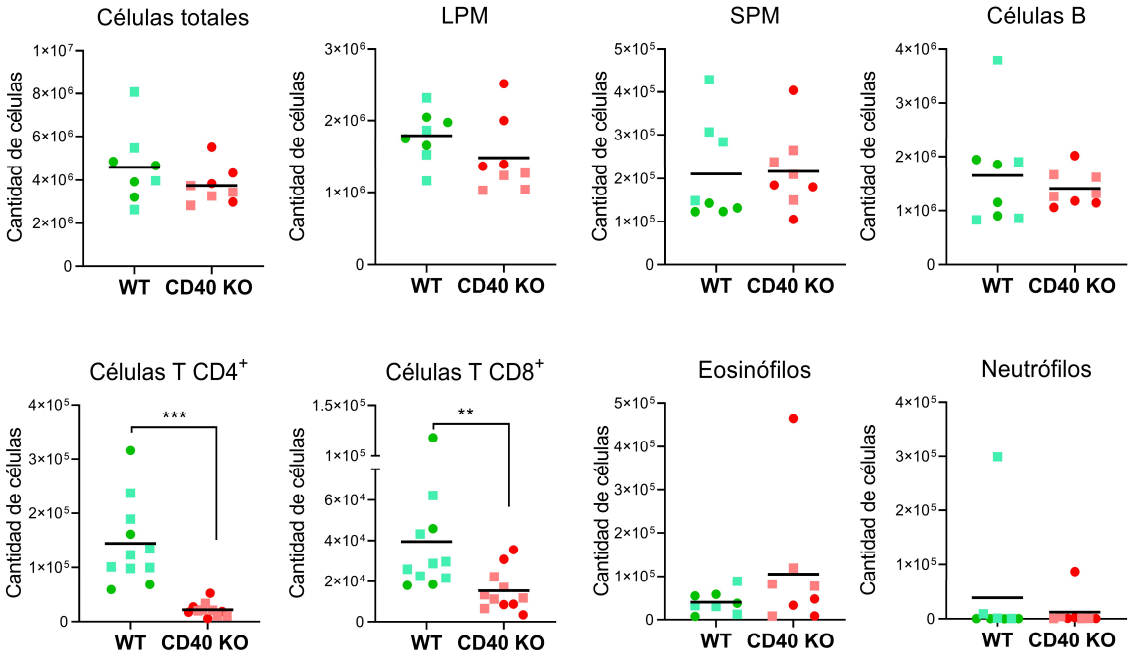


Figura 4.4.1. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.4.1. En la CP de ratones CD40 KO hay menos células T CD4⁺ y CD8⁺ que en los ratones WT. Se obtuvieron muestras de CP de ratones C57BL/6 WT y CD40 KO, y se evaluaron los números absolutos de los distintos tipos celulares presentes utilizando la estrategia de definiciones celulares basada en la ilustrada en la Figura 3.12 del capítulo de Materiales y Métodos), mediante citometría de flujo. Cada punto corresponde a un ratón, y se muestran datos de dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para WT y de rojo para CD40 KO). Los datos mostrados para LPM y SPM son parte de los incluidos en la figura 4.2.13, ya que fueron obtenidos en los mismos experimentos. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos.

A continuación, se evaluó con mayor detalle si la ausencia de células T afectaba de manera equitativa a los subtipos V, MC y/o ME. Como se muestra en la Figura 4.4.2, en la CP de los ratones CD40 KO se observa una marcada escasez de células T V, y en particular de células T CD4⁺ V. Asimismo, se detectó una reducción significativa en las células T CD4⁺ MC y ME, y en menor medida, en las células T CD8⁺ ME.

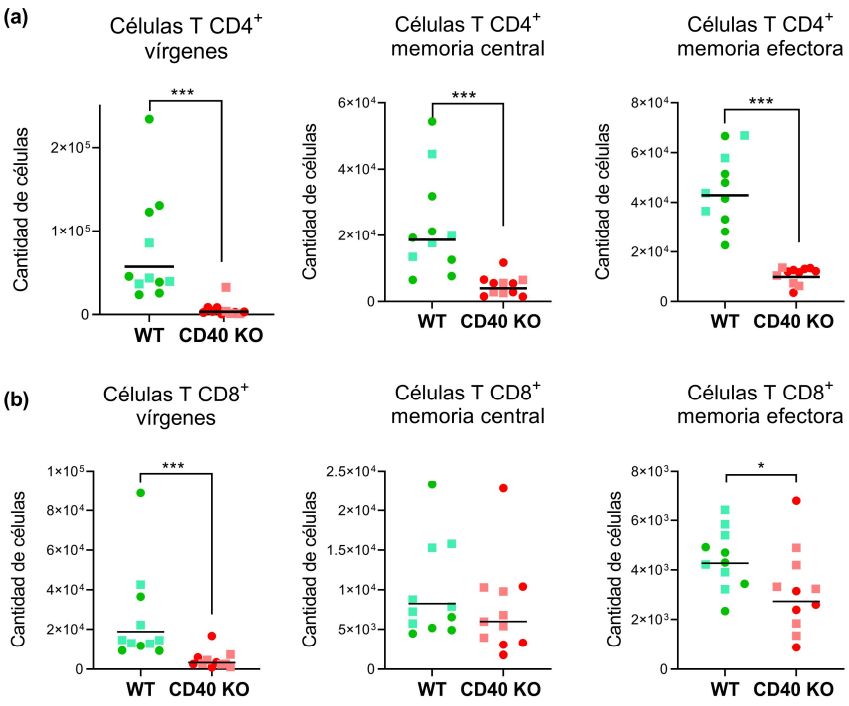


Figura 4.4.2. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.4.2. En la CP de ratones CD40 KO son particularmente escasas las células T vírgenes. Se obtuvieron muestras de CP de ratones C57BL/6 WT y CD40 KO, y se evaluaron los números absolutos de células T $CD4^+$ (a) y $CD8^+$ (b) vírgenes, de memoria central y memoria efectora definidos en base a la expresión de CD62L y CD44, por citometría de flujo (definidas en la Figura 3.10 del capítulo de Materiales y Métodos). Cada punto corresponde a un ratón y se muestran datos de dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para WT y de rojo para CD40 KO). Para el análisis estadístico se realizó la transformación logarítmica de los datos y se realizó el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos.

A raíz de este resultado, surgió el interrogante de si la falta de células observada sería un fenómeno exclusivo de la CP o también afectaría a otros sitios, y en particular a los órganos linfoides secundarios. Así, se evaluó la cantidad de células T $CD4^+$ y T $CD8^+$, así como sus respectivos subtipos, en bazo y ganglios mesentéricos de animales WT y CD40 KO. Como se muestra en la Figura 4.4.3, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos para ninguno de los subtipos estudiados, si bien hubo tendencias a menores números de células de fenotipos CM y EM en el bazo de los animales CD40 KO. Esto sugiere que otros sitios linfoides probablemente tampoco se vean afectados de forma similar a la CP, y que, en cambio, el déficit observado en células $CD4^+$ V esté limitado a la CP, o potencialmente limitado al conjunto de los sitios no linfoides, ya sean cavidades u órganos sólidos.

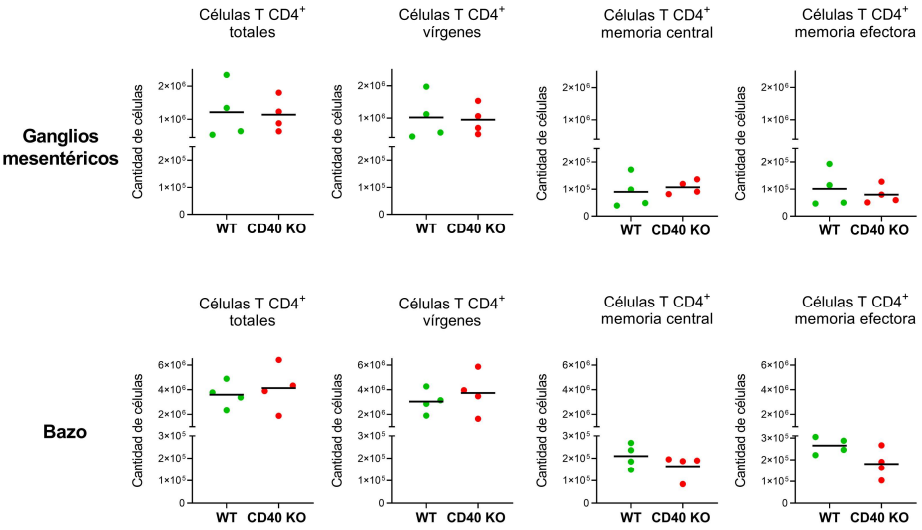


Figura 4.4.3. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.4.3. En los ganglios mesentéricos y el bazo de ratones CD40 KO se observan cantidades de células T CD4$^+$ similares a las presentes en los ratones WT. Se obtuvieron muestras de ganglios mesentéricos y bazo de ratones C57BL/6 WT y CD40 KO, y se evaluaron los números absolutos células T CD4$^+$ vírgenes, de memoria central y memoria efectora definidos en base a la expresión de CD62L y CD44, por citometría de flujo. Cada punto corresponde a un ratón y se muestran datos de un único experimento.

4.4.2 El bloqueo de CD40L causa una disminución en los números de células T CD4$^+$ en la CP, así como también de otros tipos celulares

Si bien los resultados obtenidos hasta el momento eran claros y robustos, es importante señalar que la escasa presencia de células T CD4$^+$ V en la CP de los ratones CD40 KO podría ser resultado de la ausencia de interacción de CD40 con un ligando alternativo a CD40L o una alteración genética adicional y desconocida ocurrida durante la generación de los animales deficientes en CD40, que impide la permanencia de las células T V en la CP. Además, el reordenamiento genético de los ratones deficientes en CD40 podría haber provocado un defecto inherente en las células T V, originado durante su desarrollo y que fuera independiente de las interacciones cotidianas con CD40L. Por lo tanto, como sistema experimental alternativo y complementario, se inyectaron ratones WT con el anticuerpo bloqueante de CD40L y se evaluaron los números de células en la CP (Figura 4.4.4).

Se observaron claras tendencias a disminución en los números de células T CD4$^+$ y CD8$^+$ en presencia del anticuerpo MR1, en comparación con el grupo control, con una reducción más pronunciada en las células T de fenotipo V (Figura 4.4.5). Además, los números de otros tipos de células circulantes, como células B, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, se vieron afectados por el bloqueo de CD40L. Sin embargo, los LPM, el único tipo celular de los analizados completamente residente en la CP, no se vieron afectados por el MR1. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la interacción entre CD40 y CD40L podría estar implicada en el ingreso o la retención de células T CD4$^+$ y CD8$^+$ V en la CP. Además, el CD40L podría participar, posiblemente a través de receptores alternativos, sin participación de CD40, en el ingreso o la retención de otras células migratorias.

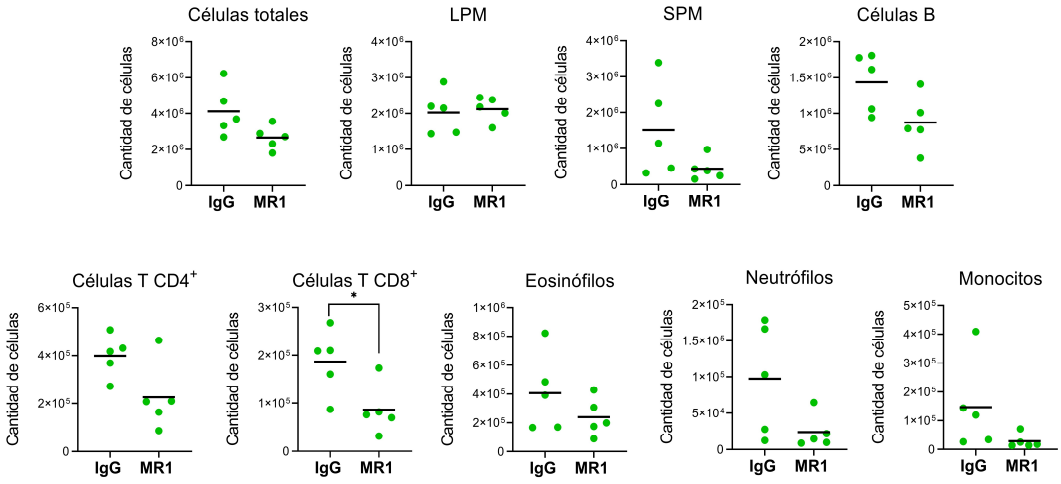


Figura 4.4.4. El bloqueo de CD40L parece generar una reducción en los números de células circulantes presentes en la CP. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. el anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1") o anticuerpo control ("IgG"). Se administró una dosis diaria de 100 µg del anticuerpo correspondiente durante dos días consecutivos, y 24 horas después de la segunda dosis, los animales se sometieron a eutanasia para el análisis de las células de la CP. Se determinaron los números absolutos de los distintos tipos celulares presentes en la cavidad utilizando una estrategia de definiciones celulares basada en la descrita en la Figura 3.12 del capítulo de Materiales y Métodos agregando Ly-6G como marcador de neutrófilos) mediante citometría de flujo. Los datos corresponden a un único experimento, cada punto corresponde a un ratón, y el análisis estadístico se realizó con un test-t paramétrico.

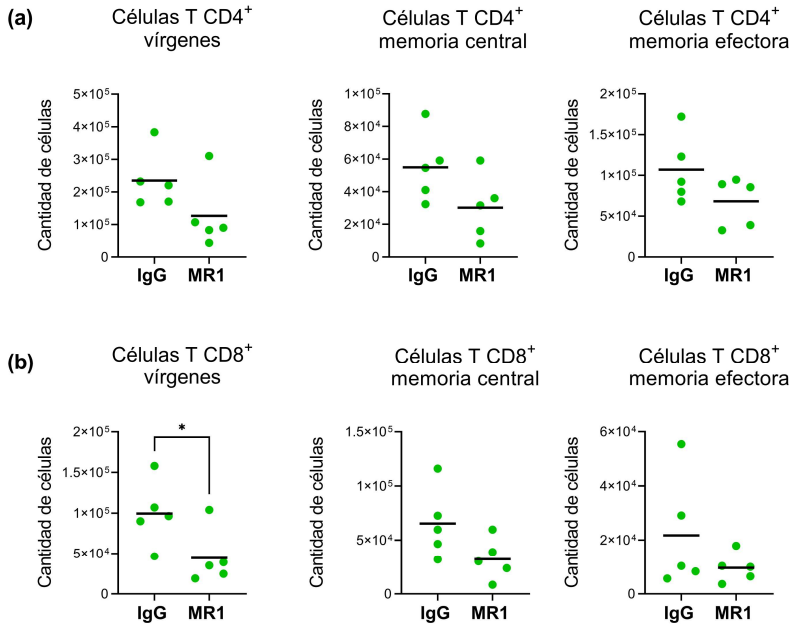


Figura 4.4.5. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.4.5. La reducción en la cantidad de células T CD4$^+$ y T CD8$^+$ en la CP que generaría el bloqueo de CD40L abarcaría a las células vírgenes, CM y EM. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con el anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1") o anticuerpo control ("IgG") como se describió en la Figura 4.4.4. Se determinaron los números absolutos de células T CD4$^+$ (a) y CD8$^+$ (b) vírgenes, de memoria central y memoria efectora presentes en la CP, definidas en base a la expresión de CD62L y CD44, por citometría de flujo como se muestra en la Figura 3.10 del capítulo de Materiales y Métodos. Los datos corresponden a un único experimento, cada punto corresponde a un ratón, y el análisis estadístico se realizó con un test-t paramétrico.

4.4.3 La falta de células T en la CP de los ratones CD40 KO no incluye una deficiencia en células T reguladoras

Finalmente, se evaluó la posibilidad de que la falta de células T en la CP incluyera una deficiencia en las células Tregs en el sitio. Para ello, se evaluaron la frecuencia y los números absolutos de células Tregs (FOXP3$^+$) en la CP (Figura 4.4.6). Se observó una mayor proporción de Tregs en la CP de los ratones CD40 KO en comparación con los WT, pero con menores números absolutos. Este resultado sugiere que dentro de cada subtipo de células T CD4$^+$ bajan más las células T efectoras que las Tregs.

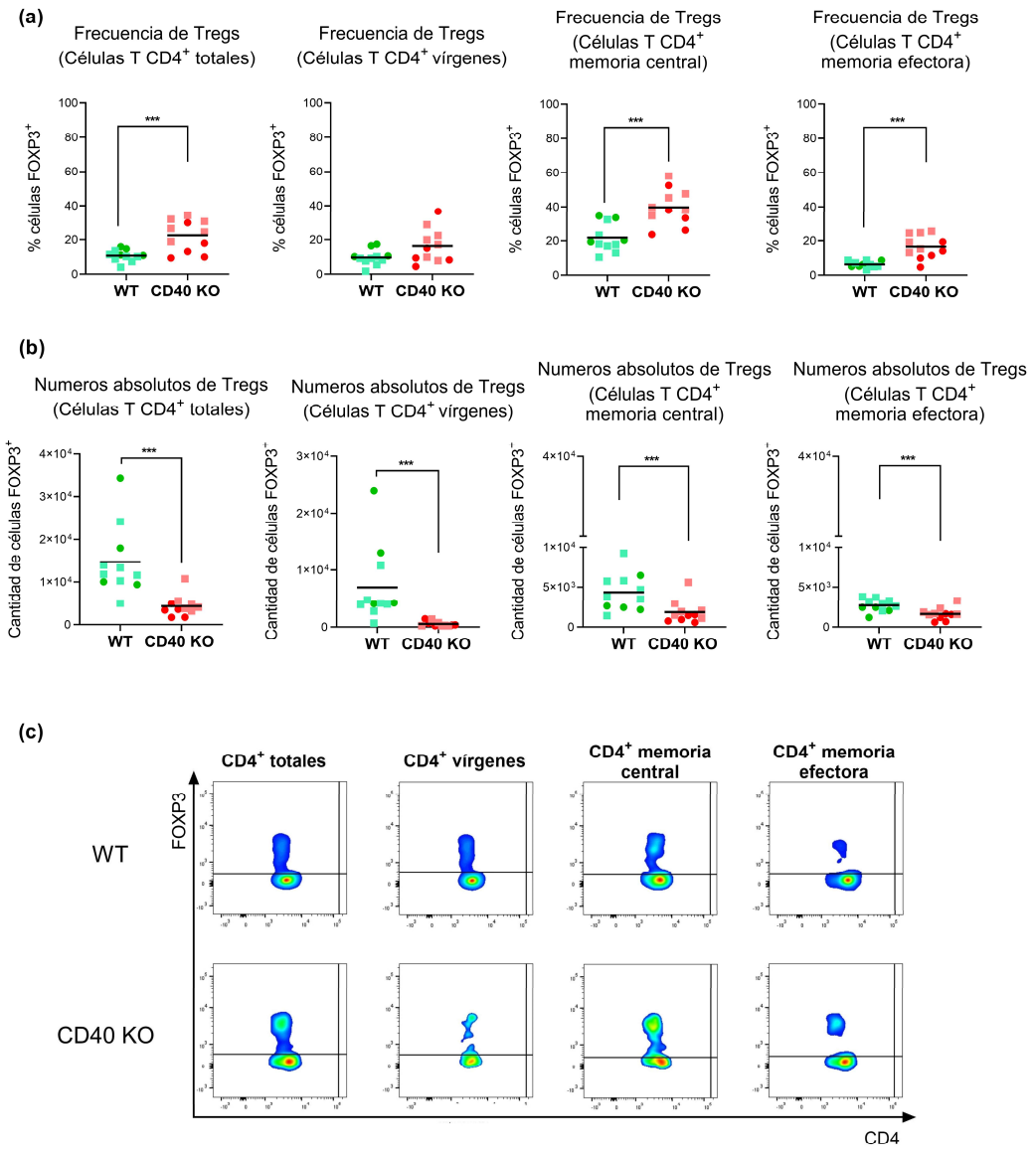


Figura 4.4.6. En la CP de ratones CD40 KO se observan menos células T CD4⁺ reguladoras que en los ratones WT, pero en mayor frecuencia en relación al conjunto de las células CD4⁺. Se obtuvieron muestras de CP de ratones C57BL/6 WT y CD40 KO, y se evaluó la proporción de células T CD4⁺ reguladoras (Tregs), definidas por la expresión de FoxP3, mediante citometría de flujo. Los datos se expresan para el total de células T CD4⁺ y para cada subtipo (vírgenes, de memoria central o memoria efectora), en términos de porcentajes de células positivas (a), así como en números absolutos (b), para cada ratón, junto con los promedios correspondientes. Se muestran también *dot plots* representativos para cada condición (c). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde para WT y de rojo para CD40 KO). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos.

En resumen, en las primeras tres secciones del capítulo de Resultados de este trabajo, se ha demostrado que el CD40L endógeno presente en condiciones basales en la CP no afecta las respuestas de los macrófagos a la IL-4 exógena. Sin embargo, los resultados presentados en esta cuarta sección sugieren que el CD40L endógeno, y más específicamente, el expresado en la superficie de las células T $CD4^+$ V, a través de su interacción con CD40, podría estar involucrado en el mantenimiento homeostático de los números de las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ en la CP, especialmente de fenotipo V. Además, CD40L presente basalmente podría sea necesario para la presencia de otros tipos celulares migratorios en la cavidad, si bien en ello podrían intervenir receptores alternativos a CD40.

4.5 Resultados 5: Agonistas exógenos de CD40

4.5.1 El sCD40L inhibe la polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales en cultivo

Para evaluar el impacto del CD40L exógeno en la respuesta de los macrófagos peritoneales a la IL-4 en cultivo, se utilizó la forma trimérica soluble de CD40L (sCD40L), así como un anticuerpo agonista de CD40 (1C10). En esta tesis se presentan únicamente, y de manera muy breve, los resultados obtenidos con sCD40L, ya que los experimentos *in vitro* con el anticuerpo 1C10, así como el análisis más detallado del efecto del sCD40L, han sido realizados por el Lic. Ignacio González, en el marco del mismo proyecto de investigación.

En primer lugar, se cultivaron células totales de la CP de ratones WT y CD40 KO, y se estimularon con IL-4 en presencia o ausencia de sCD40L. Luego de 48 horas, se evaluó la expresión de RELM-α e Ym1 en los macrófagos totales cultivados. Como se muestra en la Figura 4.5.1, el sCD40L inhibió fuertemente la expresión de RELM-α, y en menor medida, la de Ym1 en los macrófagos WT. Además, en los macrófagos CD40 KO se observó una leve tendencia a la inhibición de RELM-α, pero no de Ym1. Estos resultados luego fueron confirmados y ampliados por I. González, llegándose a la conclusión que receptores adicionales a CD40 podrían estar involucrados en la inhibición de la expresión de RELM-α observada en macrófagos WT.

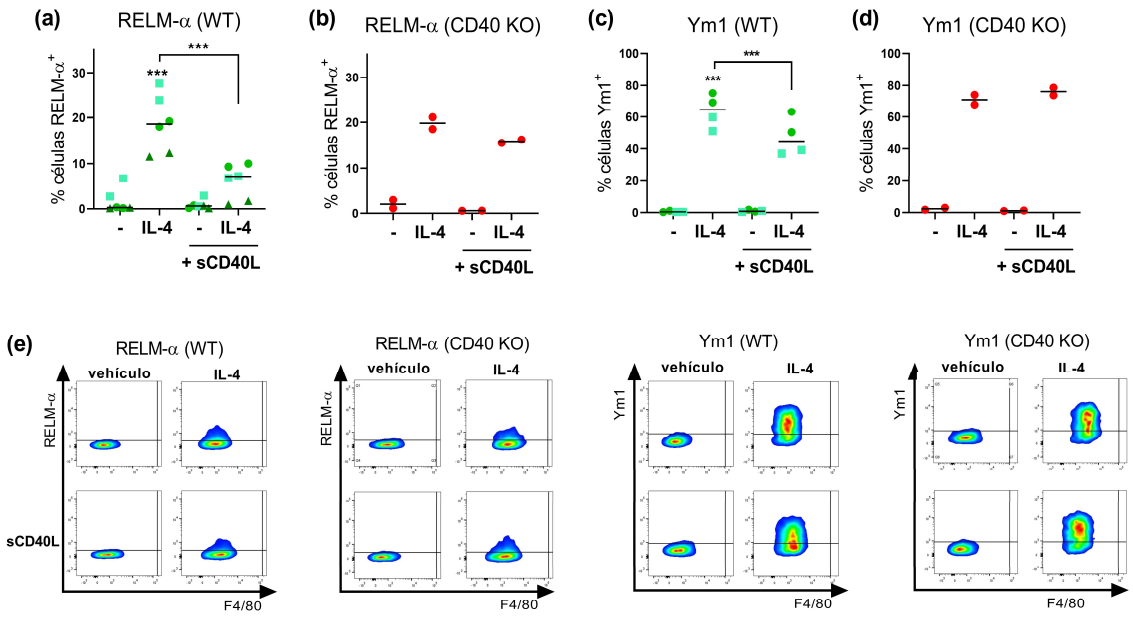


Figura 4.5.1. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.5.1. El sCD40L inhibe la polarización M(IL-4) de los macrófagos de CP en cultivo. Se cultivaron células de la CP de ratones C57BL/6 WT o CD40 KO con IL-4 y CD40L soluble (sCD40L). Luego de 48 horas en cultivo, se midió la expresión de RELM-α (a) y (b) e Ym1 (c) y (d) en los macrófagos (definidos como en la Figura 3.3 del capítulo de Materiales y Métodos) por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada muestra y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición (e). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a 1-3 experimentos independientes (con distintas formas y tonalidades de verde para WT y en rojo para CD40 KO). Cada punto representa una réplica técnica dentro de cada experimento. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos solamente cuando el experimento se realizó más de una vez. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

Por otro lado, como se mencionó previamente, la IL-4 por sí sola no promueve la proliferación de macrófagos *in vitro* (77). Sin embargo, basándose en que las células B proliferan en respuesta a la ligación de CD40 en sinergia con la IL-4, se planteó la posibilidad de que el CD40L, junto con la IL-4, también pudiera inducir la proliferación de macrófagos en cultivo. Para evaluar esto, se midió la proliferación de los macrófagos presentes en cultivos de células totales de CP de ratones WT estimuladas con IL-4 en presencia de sCD40L (Figura 4.5.2). Como era esperable, las células B presentes en la mezcla respondieron con proliferación a la estimulación con sCD40L, efecto que se potenció al combinar sCD40L con IL-4. En contraste, los macrófagos no mostraron evidencia de proliferación frente a la estimulación combinada de IL-4 y sCD40L. En la Figura 4.5.2 se muestran resultados de proliferación determinados exclusivamente por la expresión de Ki-67, dado que la incorporación de BrdU en este sistema no refleja la síntesis de ADN por parte de los macrófagos, sino que genera una señal artefactual, probablemente derivada de la fagocitosis de células B proliferantes (en respuesta a IL-4 + sCD40L), que posteriormente entraron en apoptosis. El análisis de este artefacto, así como el estudio de la proliferación de IMacs en cultivos estimulados con sCD40L no se muestran en este trabajo, ya que han sido realizado por el I. González como parte de su tesis de Doctorado.

Por lo tanto, el sCD40L no afecta la ausencia de respuesta de proliferación *in vitro* de los macrófagos a la IL-4.

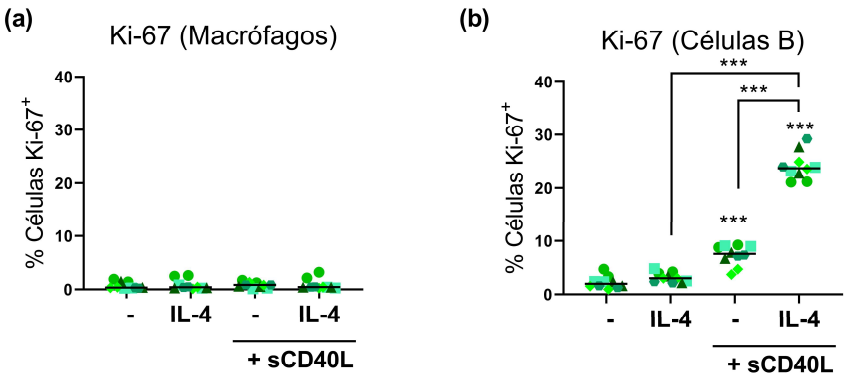


Figura 4.5.2. La estimulación con IL-4 + sCD40L induce la proliferación de células B, pero no de macrófagos, en cultivos de células totales de la CP en condiciones basales. Se cultivaron células totales de la CP de ratones C57BL/6 WT en ausencia y presencia de IL-4 y/o sCD40L. Luego de 48 horas en cultivo se analizó la proliferación de los macrófagos (a) y células B (b) por expresión de Ki-67 mediante citometría de flujo. Los datos se presentan como porcentajes de células positivas para cada muestra, junto con los promedios correspondientes. Los datos corresponden a cinco experimentos independientes (con distintas formas y tonalidades de verde). Cada punto representa una réplica técnica dentro de cada experimento. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con sCD40L y las condiciones correspondientes sin sCD40L.

4.5.2 El anticuerpo agonista de CD40 inhibe fuertemente las respuestas de los macrófagos peritoneales a la IL-4 exógena *in vivo*

Para evaluar el efecto del CD40L exógeno en las respuestas de los macrófagos peritoneales *in vivo*, se realizó en primer lugar una puesta a punto destinada a determinar la dosis adecuada del anticuerpo 1C10, basada en su capacidad para inducir la activación de macrófagos y células B de la CP. Para ello se inyectaron ratones con distintas dosis de 1C10, y a las 24 horas se analizaron los números de células totales de la CP, así como de macrófagos y células B (Figura 4.5.3). Se observó que el 1C10 induce una marcada reducción, dependiente de la dosis, en los números de células de la CP recuperadas, más marcada en los macrófagos que en las células B, de modo que, a la dosis más alta del anticuerpo, prácticamente no se detectan macrófagos. Además, se verificó que la presencia del 1C10 potencia la expresión de marcadores de activación como CD86, ICAM-1 y MHCII en macrófagos, así como CD80, CD86 e ICAM-1 en las células B (Figura 4.5.4). Por otro lado, se observó que los hígados de los ratones inyectados con 1C10 presentaban

una tonalidad grisácea, en contraste con su color rojizo habitual, lo que podría estar indicando la presencia de daño hepático, posiblemente asociado a una respuesta inflamatoria sistémica y/o a toxicidad inducida por el tratamiento (Figura 4.5.5).

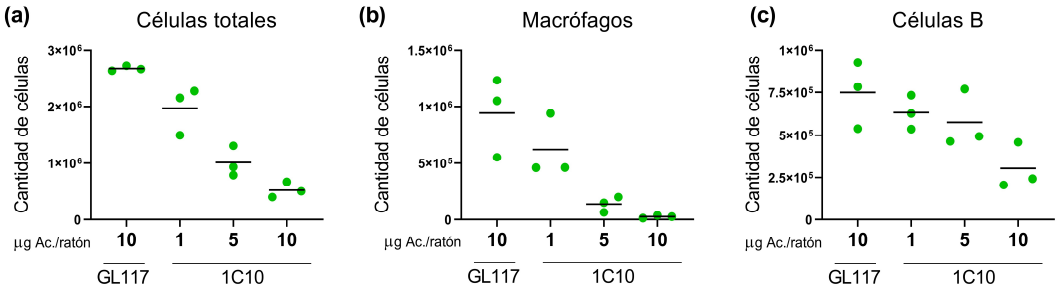


Figura 4.5.3. La inyección del anticuerpo agonista de CD40 reduce la recuperación de las células de la CP de manera dependiente de la dosis. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con distintas dosis de un anticuerpo agonista de CD40 ("1C10") o su anticuerpo control ("GL117"). Luego de 24 horas, se sometió a los animales a eutanasia y se contabilizaron las células totales obtenidas de la CP (a), así como la presencia de macrófagos totales (definidos como $CD11b^{+}$ $F4/80^{+}$) (b) y células B (c), por citometría de flujo. Se muestran los resultados en números absolutos, calculados a partir de los porcentajes de células obtenidos en la citometría de flujo y el conteo inicial de células. Los datos corresponden a un único experimento donde cada punto corresponde a un ratón y el valor promedio correspondiente para cada grupo.

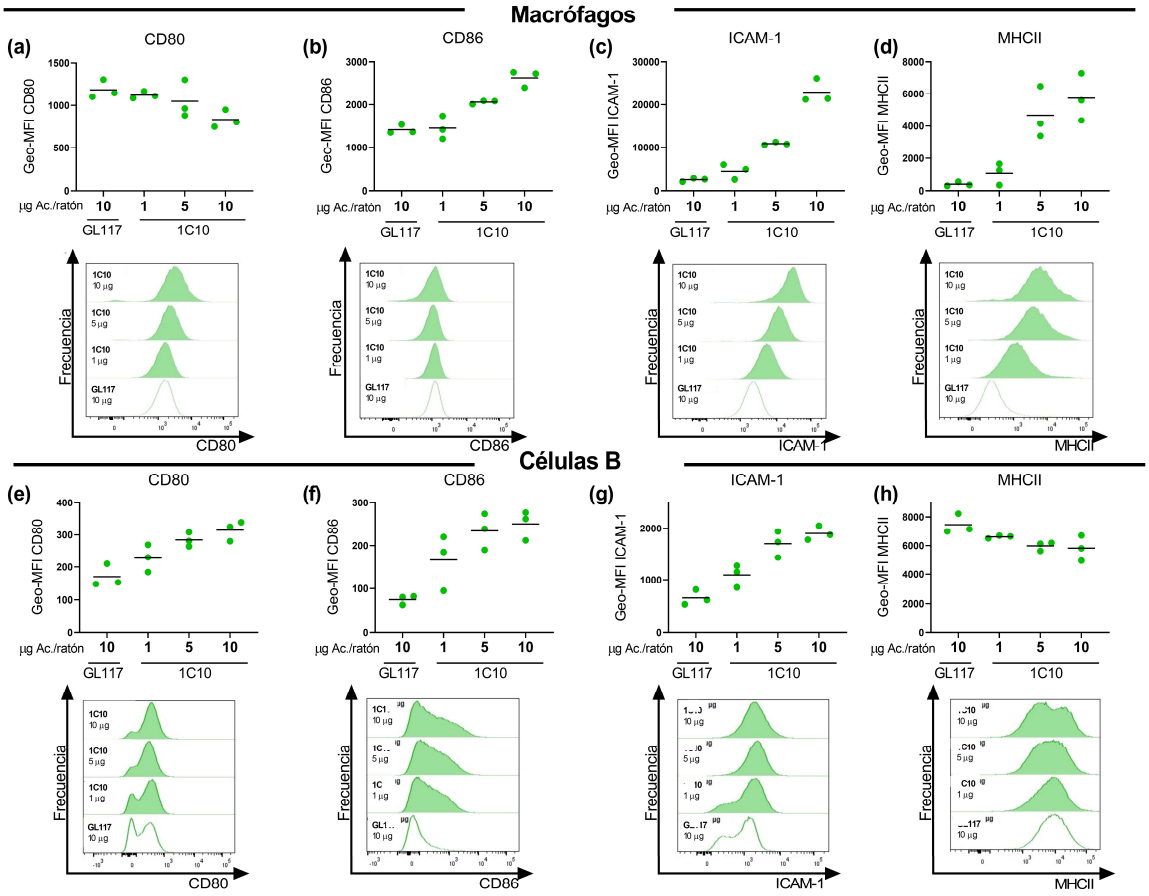


Figura 4.5.4. La administración del anticuerpo agonista de CD40 tiende a potenciar la expresión de marcadores de activación en los macrófagos y células B de la CP. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con distintas dosis de un anticuerpo agonista de CD40 ("1C10") o su anticuerpo control ("GL117"). Luego de 24 horas, se sometió a los animales a eutanasia y se analizó la expresión de CD80 ((a) y (e)), CD86 ((b) y (f)), ICAM-1 ((c) y (g)) y MHCII ((d) y (h)) en los macrófagos totales y células B de la CP por citometría de flujo. Se muestran los datos en términos de media geométrica de fluorescencia (Geo-MFI) para cada marcador, e histogramas representativos para cada condición. Los datos corresponden a un único experimento donde cada punto corresponde a un ratón y el valor promedio correspondiente para cada grupo.

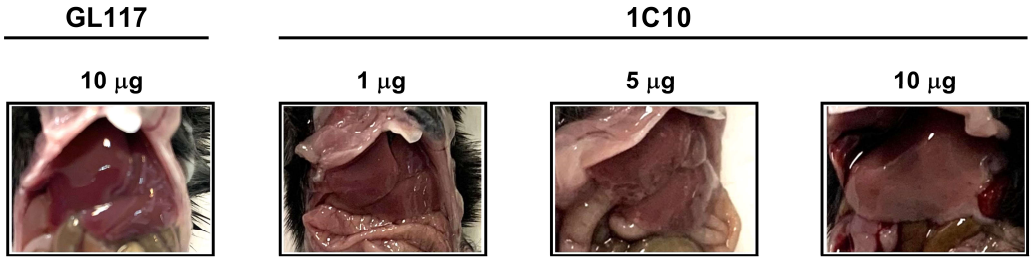


Figura 4.5.5. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.5.5. El aspecto macroscópico del hígado tras el tratamiento con anticuerpo agonista de CD40 sugiere hepatotoxicidad. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con distintas dosis de un anticuerpo agonista de CD40 ("1C10") o su anticuerpo control ("GL117"). Luego de 24 horas, se sometió a los animales a eutanasia y se obtuvieron fotos del hígado. Se muestran imágenes representativas para cada condición.

En base a lo expuesto anteriormente, se optó por utilizar una dosis intermedia de anticuerpo (3 µg por ratón). Según se confirmó en los experimentos subsiguientes (específicamente en las condiciones sin IL-4c, ya que estos experimentos involucraron inyección de IL-4c), esta dosis permitió una buena recuperación de células de la CP y ausencia de daño hepático a nivel macroscópico, al mismo tiempo que fue suficiente para generar activación de células B y macrófagos.

Se inyectaron ratones WT con IL-4c en conjunto con el anticuerpo 1C10 o el anticuerpo control en la dosis puesta a punto, y a las 48 horas se analizaron las respuestas de los macrófagos de la CP. En primer lugar, se observó que el anticuerpo 1C10 inhibió la expresión de F4/80 en los macrófagos (Figura 4.5.6a), lo que impidió aplicar la misma definición de macrófagos utilizada en otros experimentos, que clasifica a los LPM y SPM según la expresión de F4/80 y MHCII. Además, se observó que el 1C10 no modifica la expresión de Tim4 (Figura 4.5.6b), lo que sugiere que el efecto observado sobre la expresión de F4/80 no refleja una sustitución de los LPM por macrófagos reclutados, sino una disminución genuina de los niveles de F4/80 en los macrófagos residentes. Por lo tanto, específicamente para estos experimentos, se optó por discriminar a los macrófagos en $Tim4^{+}$, que incluye la mayoría de los LPM, y $Tim4^{-}$, que abarca a los SPM y una parte minoritaria de los LPM (55).

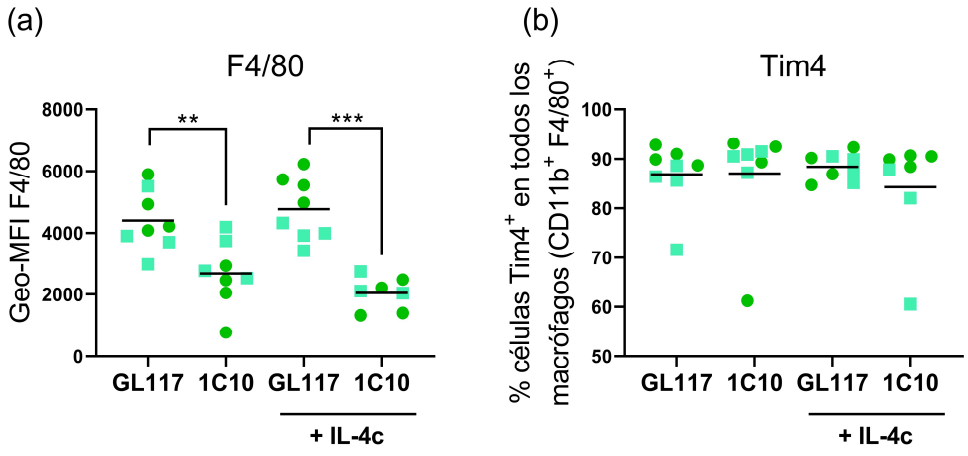


Figura 4.5.6. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.5.6. La administración del anticuerpo agonista de CD40 reduce la expresión de F4/80 en los macrófagos residentes de la CP. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con IL-4c o vehículo solamente, junto con el anticuerpo agonista de CD40 ("1C10") o anticuerpo control ("GL117"). Luego de 48 horas, se analizó la expresión de F4/80 (a) y Tim4 (b) en los macrófagos totales de la CP por citometría de flujo. Se muestran los resultados para cada ratón y los promedios correspondientes. Los datos de F4/80 se representan en términos de media geométrica de fluorescencia (Geo-MFI), y para Tim4 como porcentaje de células positivas dentro del total de macrófagos. Se muestran datos de dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos.

A continuación, se midió la expresión de RELM-α y Ym1 en los macrófagos de la CP (Figura 4.5.7). Se observó que el anticuerpo 1C10 inhibe la expresión de RELM-α tanto en los macrófagos $Tim4^+$ como $Tim4^-$, en concordancia con lo observado para los macrófagos en cultivo con el sCD40L. Sin embargo, el 1C10 no inhibió de manera significativa la expresión de Ym1, aunque se observó una leve tendencia en la misma dirección que para RELM-α.

Se analizó también el efecto del anticuerpo 1C10 sobre la proliferación de los macrófagos en respuesta a IL-4c (Figura 4.5.8), y se observó que éste inhibió la proliferación tanto de los macrófagos $Tim4^+$ como $Tim4^-$. En contraste, el agonista de CD40 indujo por sí solo la proliferación de las células B de la CP, y este efecto se vio potenciado en presencia de IL-4c.

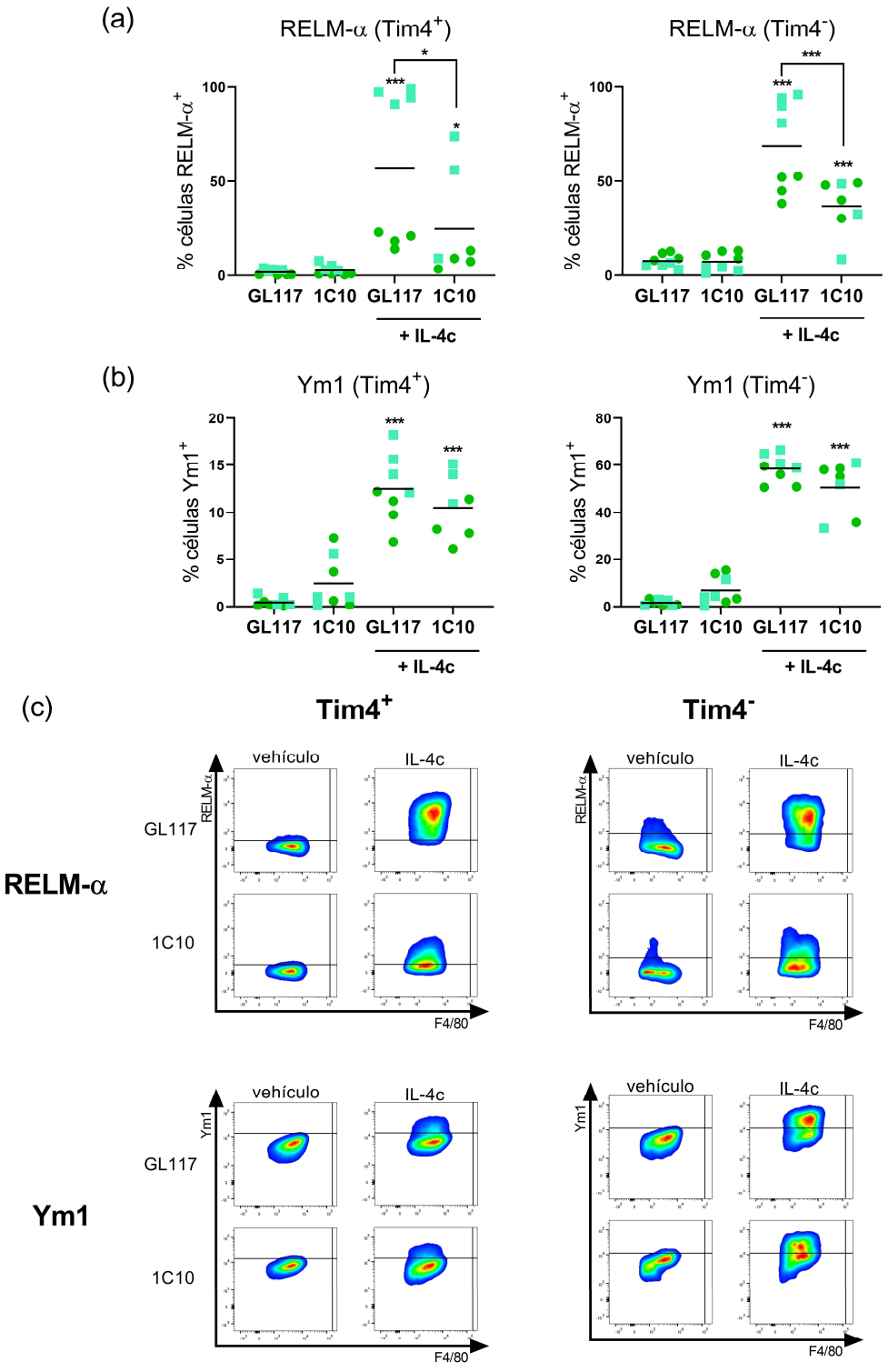


Figura 4.5.7. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.5.7. El anticuerpo agonista de CD40 inhibe la expresión de RELM-α en los macrófagos de la CP. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con IL-4c o vehículo solamente, junto con el anticuerpo agonista de CD40 ("1C10") o anticuerpo control ("GL117"). Luego de 48 horas, se sometió a los animales a eutanasia para el análisis de las células de la CP. Se analizó la expresión de RELM-α (a) e Ym1 (b) en los macrófagos $Tim4^{+}$ y $Tim4^{-}$ (definidos como en la Figura 3.7 del capítulo de Materiales y Métodos), por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición (c). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

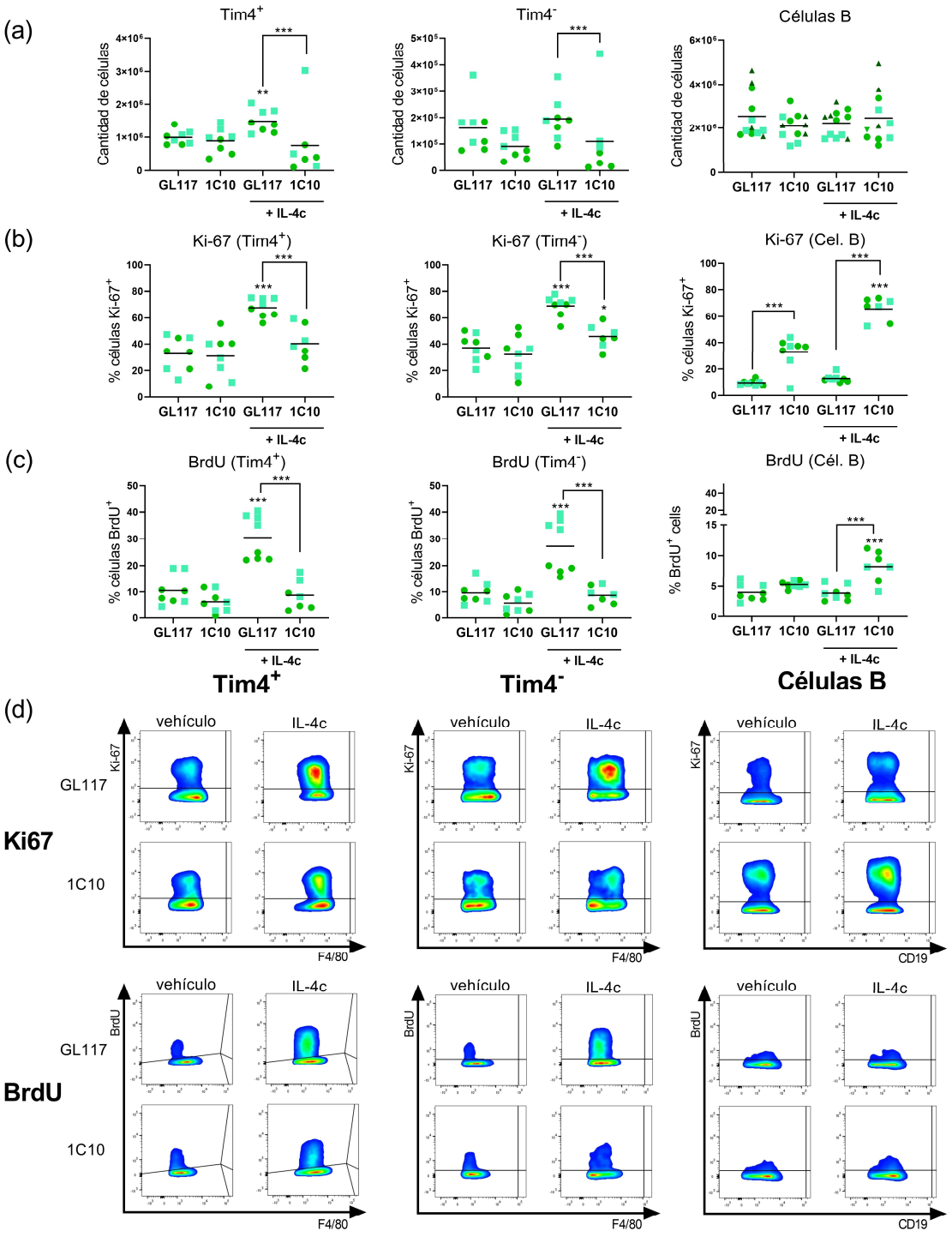


Figura 4.5.8. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.5.8. El anticuerpo agonista de CD40 inhibe la proliferación de los macrófagos de la CP. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con IL-4c o vehículo solamente, junto con el anticuerpo agonista de CD40 ("1C10") o anticuerpo control ("GL117"). Luego de 48 horas, se sometió a los animales a eutanasia para el análisis de las células de la CP. Se analizaron los números de macrófagos $Tim4^+$ y $Tim4^-$, y las células B (a), así como su proliferación por expresión de Ki-67 (b) e incorporación de BrdU (c), por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos para cada condición (c). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

Finalmente, se evaluó la expresión de marcadores de activación en macrófagos en respuesta al agonista de CD40, tanto en presencia como en ausencia de IL-4c (Figura 4.5.9). Tal como se había observado previamente, el 1C10 potenció la expresión de CD80, ICAM-1 y MHCII, y la presencia de IL-4c no alteró significativamente estos efectos.

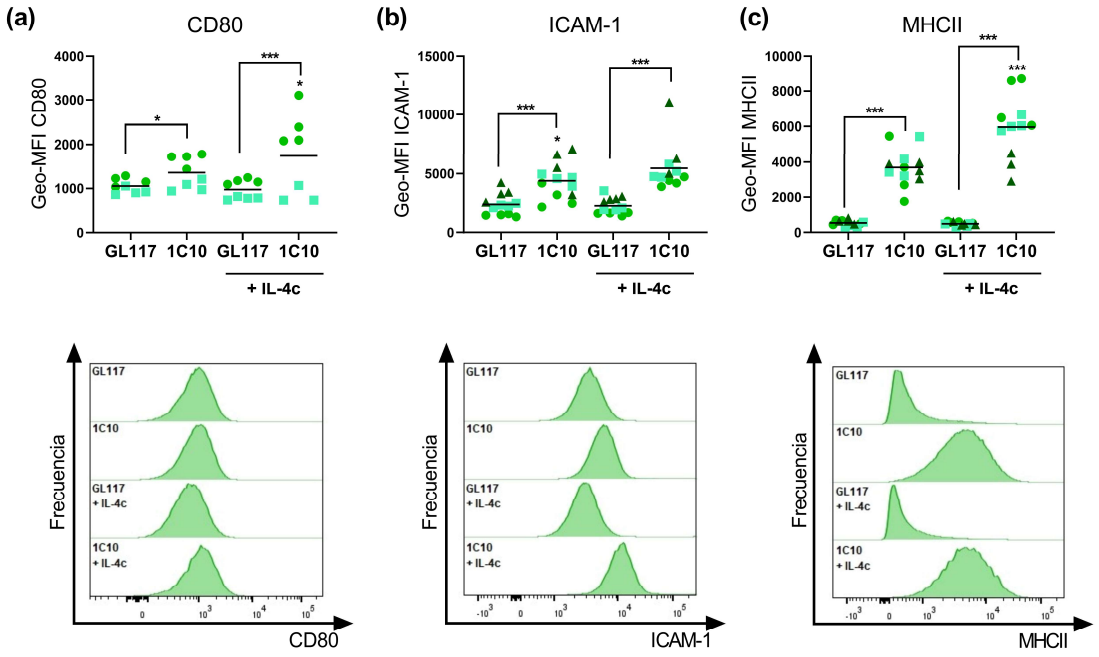


Figura 4.5.9. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.5.9. La administración del agonista de CD40 potencia la expresión de CD80, ICAM-1 y MHCII en macrófagos, y este efecto es potenciado por la IL-4, al menos para CD80 y MHCII. Se inyectaron ratones C57BL/6 WT vía i.p. con IL-4c o vehículo solamente, junto con el anticuerpo agonista de CD40 ("1C10") o anticuerpo control ("GL117"). Luego de 48 horas, se sometió a los animales a eutanasia para el análisis de las células de la CP. Se analizó la expresión de CD80 (a), ICAM-1 (b) y MHCII (c) en los macrófagos totales ($CD11b^+$ $F4/80^+$) de la CP por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de media geométrica de fluorescencia para cada ratón y los promedios correspondientes, así como histogramas representativos para cada condición. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones que incluyen estimulación con IL-4 y las condiciones correspondientes sin IL-4.

En resumen, la activación exógena de CD40 se opone a la acción de la IL-4c, inhibiendo fuertemente los efectos que ésta induce sobre los macrófagos, con la excepción, entre las variables medidas, de la inducción de Ym1.

4.6 Resultados 6: CD40L en el contexto de la infección por *H. polygyrus*

4.6.1 Descriptiva de la CP durante la infección por *H. polygyrus*

En los modelos con IL-4 administrada de forma exógena descritos previamente, se observó un contraste claro entre la ausencia de efectos sobre las respuestas de los macrófagos del CD40L endógeno (presente en condiciones basales) y los fuertes efectos sobre las mismas respuestas de la activación exógena de CD40. Sin embargo, estos modelos se alejan de las condiciones fisiológicas presentes durante una respuesta de tipo 2, dado que las dosis de IL-4 empleadas son elevadas y sistémicas, en contraposición con la IL-4 producida por células Th2 específicas de antígenos que domina en contextos de infección (49). Por lo tanto, con la finalidad de acercarse a una situación más realista, se empleó el modelo de infección murina con *H. polygyrus*.

Como se mencionó previamente, durante la infección de *H. polygyrus* hay proliferación y polarización de macrófagos en la CP, parcialmente dependiente de IL-4 a los siete días post infección (61). En este modelo, a pesar de que el gusano adulto se aloja en el intestino de los ratones, a las dos semanas post infección se ha reportado la presencia de abundantes células T $CD4^+$ con potencial de producir IL-4 (células Th2) en la CP, así como en otros sitios anatómicos incluyendo el hígado (49). En la CP y en el hígado en particular, aproximadamente un 20% y un 40% respectivamente de las células Th2 expresa el marcador de activación aguda CD69 (49). Por lo tanto, es esperable que, en esos sitios ocurra presentación de antígenos del parásito, acompañada de un aumento de CD40L de superficie en células $CD4^+$.

En base a lo expuesto, se diseñó un sistema experimental (Figura 4.6.1) con el objetivo de analizar si el CD40L inducido en el contexto de la infección impacta en las respuestas de los macrófagos de la CP. En este sistema, se infectaron ratones con *H. polygyrus* y a los seis días, se trataron los mismos ratones o ratones control "*naïve*" (sin infectar) con el anticuerpo bloqueante de CD40L o su control.

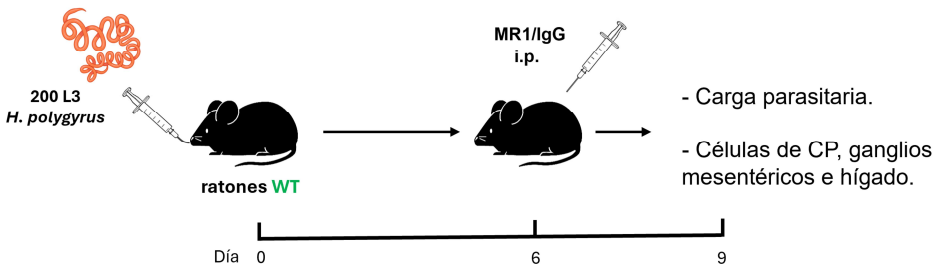


Figura 4.6.1. Diagrama de los experimentos de infección con *H. polygyrus*. Se infectaron ratones C57BL/6 WT vía oral con 200 larvas en estadio L3 de *H. polygyrus*. Luego de 6 días, se inyectaron los mismos ratones y ratones controles sin infectar ("*naïve*"), vía i.p., con el anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1") o el anticuerpo control ("IgG"). Pasadas 72 horas los animales se sometieron a eutanasia y se obtuvieron muestras de CP e hígado para su análisis por citometría de flujo y/o ELISA, así como muestras de intestino para la recuperación de los gusanos adultos y posterior recuento de la carga parasitaria.

Como primer paso, se verificó que la presencia del anticuerpo MR1 no modificara la respuesta inmune sistémica conta el parásito. Para ello se tomaron muestras de ganglios mesentéricos (ganglio drenante del intestino, donde se aloja el parásito) y se procesaron para estimular *in vitro* de forma no específica y cuantificar la producción de citoquinas intracelulares en las células T $CD4^+$, células T $CD8^+$ y células T γδ mediante citometría de flujo (datos no mostrados). Estos resultados mostraron que no hay diferencias entre las respuestas de los animales infectados inyectados con el anticuerpo MR1 y el control.

Por otro lado, se realizó el recuento de gusanos adultos a partir de los intestinos de los ratones infectados, tratados con el anticuerpo bloqueante de CD40L o anticuerpo control. Tal como se muestra en la Figura 4.6.2, los ratones inyectados con el anticuerpo bloqueante de CD40L presentaron cargas parasitarias significativamente mayores que los que recibieron anticuerpo control.

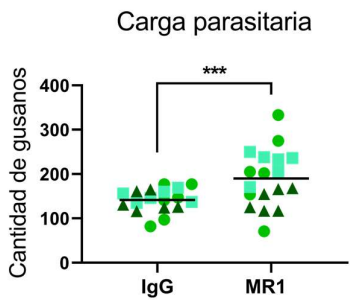


Figura 4.6.2. El bloqueo de CD40L al día seis post infección favorece un aumento en la carga parasitaria en ratones infectados con *H. polygyrus*. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se obtuvo el intestino delgado de los animales infectados solamente, y se procesaron estas muestras para recuperación de los gusanos adultos y conteo bajo lupa. Se muestran datos en términos de números absolutos para cada ratón y los promedios correspondientes. Los datos corresponden a tres experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos.

Posteriormente, se evaluaron los cambios en las poblaciones celulares presentes en la CP comparando ratones sin infectar con ratones infectados, en ambos casos en presencia del anticuerpo MR1 o del control. Para ello, se realizó un análisis multidimensional de las células de la CP utilizando UMAPs (Figura 4.6.3), en el cual se evidenciaron diferencias en las frecuencias y fenotipos de las células entre condiciones experimentales.

En ausencia de infección, la inyección del anticuerpo MR1, generó, en el *cluster* correspondiente a los LPM, una leve variación en su forma y densidad, en comparación con la condición control. Esto sugiere que las células presentes en esa región podrían estar modulando la expresión de uno o más de los marcadores utilizados por el algoritmo para generar el mapa. Además, el desplazamiento del centro de densidad indica un posible cambio cuantitativo en proporción a los números de células de alguna subpoblación dentro de los LPM. Particularmente, se observa que una pequeña subpoblación con baja expresión de CD102 aumenta en número en presencia del anticuerpo bloqueante de CD40L en comparación con el control (Figura 4.6.4). No obstante, no se detectaron cambios cuantitativos en la expresión de este marcador al analizar el total de los LPM (datos no mostrados), probablemente porque el cambio ocurre específicamente en una subpoblación minoritaria, lo que impide su visualización a nivel global.

Por otro lado, en los animales infectados y tratados con el anticuerpo control, se observó un aumento claro en los números celulares de las poblaciones de macrófagos, y concomitante disminución relativa en números de células B, en

relación a los animales no infectados (Figura 4.6.3). En cuanto al efecto del anticuerpo MR1, no se detectaron diferencias entre los animales *naïve* e infectados.

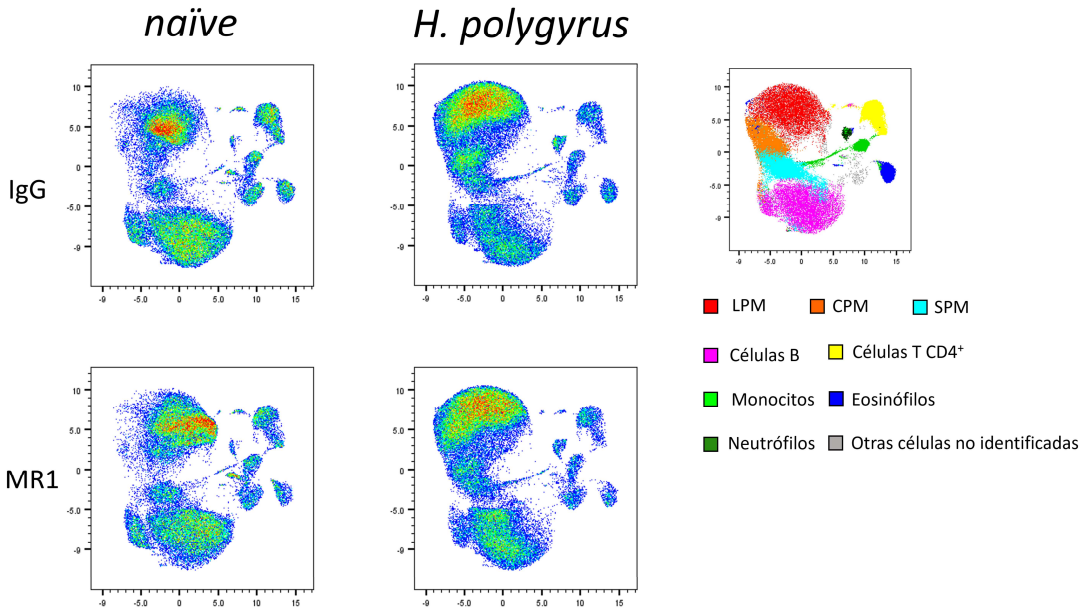


Figura 4.6.3. El análisis multidimensional de los tipos celulares presentes en la CP no revela efectos del bloqueo de CD40L en ratones infectados con *H. polygyrus*. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se obtuvieron muestras de la CP y se analizaron los distintos tipos de células presentes (definidas como en la Figura 3.9 del capítulo de Materiales y Métodos) por citometría de flujo. Se muestran UMAPs para cada condición dentro del total de células vivas detectadas en la citometría generados utilizando los parámetros FSC, SSC, CD11b, F4/80, MHCII, FRβ, CD73, CD102, CD19, Ly-6c, Siglec-F, Ly-6G y CD4. Cada diagrama fue generado a partir de un concatenado de muestras de los ratones individuales de cada grupo, para un experimento representativo.

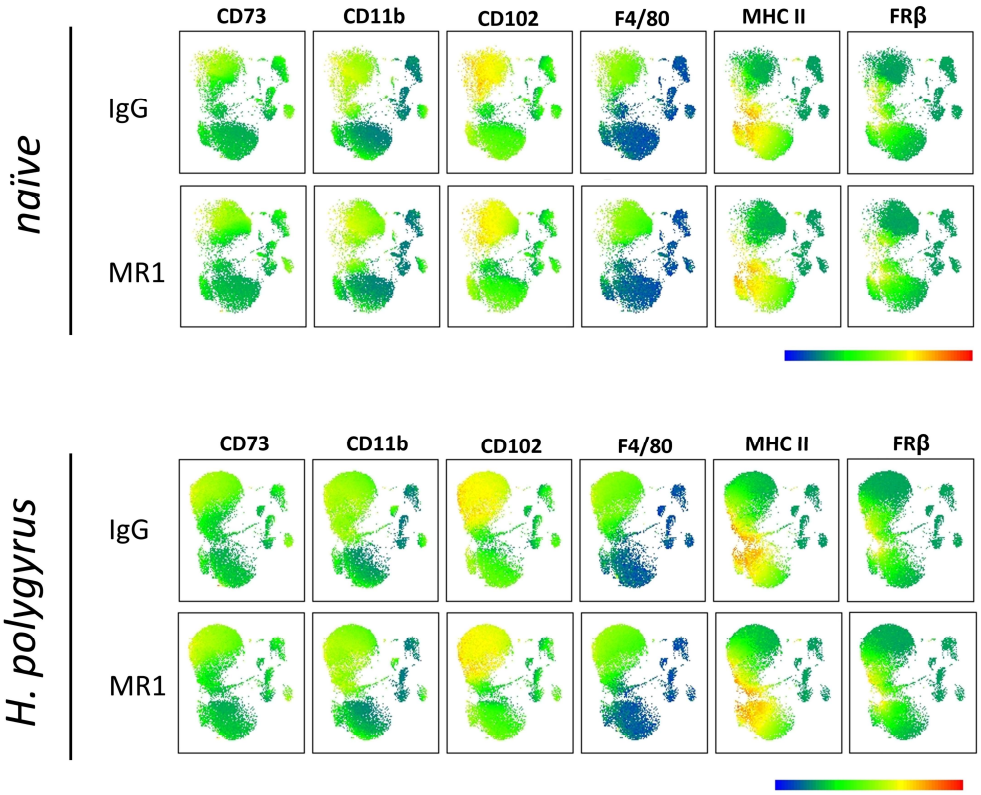


Figura 4.6.4. El análisis multidimensional de los marcadores de trayectorias de macrófagos en la totalidad de las células de la CP no revela efectos del bloqueo de CD40L en ratones infectados con *H. polygyrus*. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se realizó el análisis multidimensional de las células de la CP como se describió en la Figura 4.6.3, y se analizó mediante *"heat maps"* la expresión de CD73, CD11b, CD102, F4/80, MHCII y FRβ para los ratones control "*naïve*" o infectados "*H. polygyrus*", tratados con el anticuerpo bloqueante de CD40L ("MR1) o su control ("IgG").

Posteriormente, se analizaron en forma convencional los números de los distintos tipos celulares en la CP. Tal como se esperaba según lo presentado previamente, en los animales infectados se observó un aumento significativo en la cantidad de LPM y CPM, y, en menor medida, de SPM, en comparación con los controles, lo cual se reflejó en un incremento en el número total de células (Figura 4.6.5). Además, en los ratones infectados tratados con el anticuerpo MR1, se observaron mayores números de CPM y SPM que en los infectados tratados con anticuerpo control. También se registraron cantidades ligeramente elevadas de células B y T $CD4^+$ en presencia del anticuerpo MR1 en los animales infectados, en comparación con los no infectados tratados con el mismo anticuerpo.

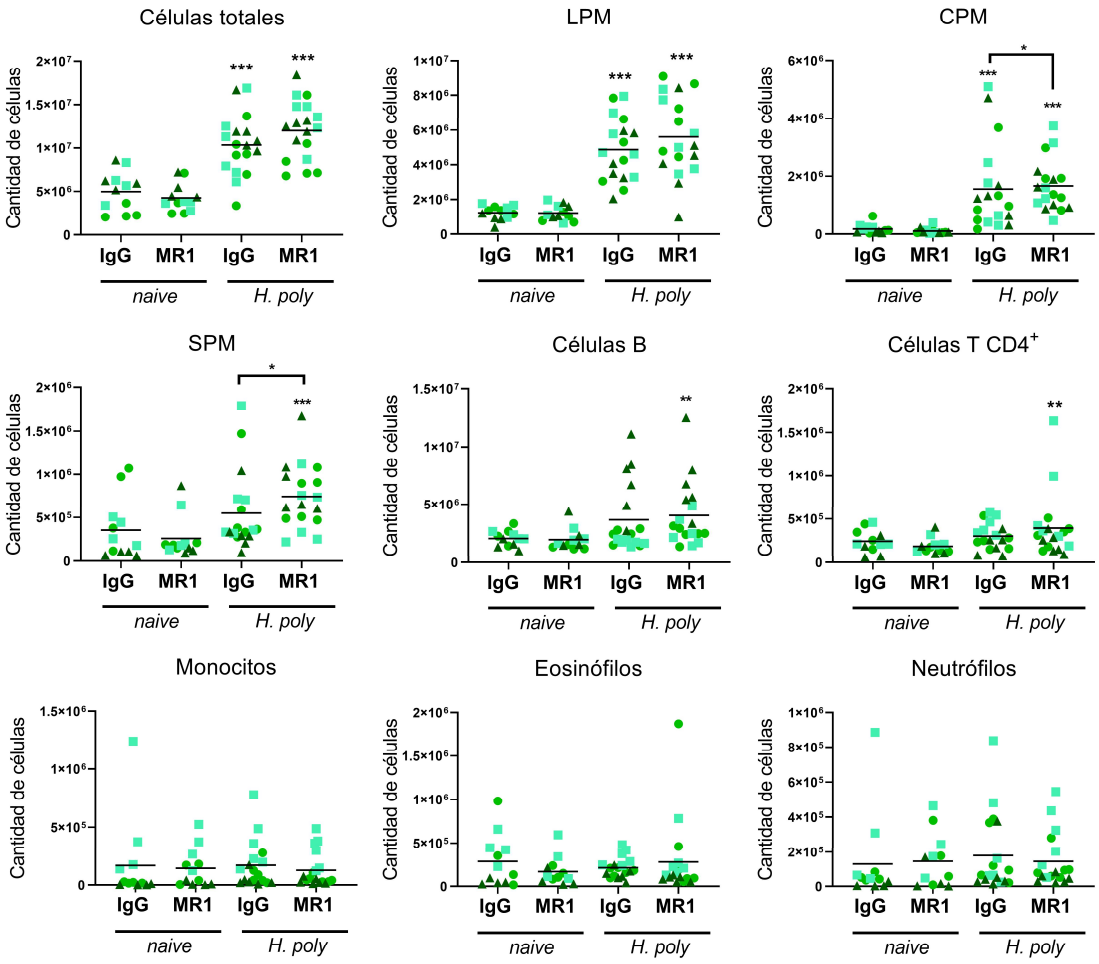


Figura 4.6.5. Durante la infección por *H. polygyrus* aumenta la cantidad de macrófagos en la CP. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se obtuvieron muestras de la CP y se analizaron los distintos tipos de células presentes por citometría de flujo definidos como en la Figura 3.9 del capítulo de Materiales y Métodos. Se muestran los resultados en números absolutos, calculados a partir de los porcentajes de células obtenidos en la citometría de flujo y el conteo inicial de células. Los datos corresponden a tres experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones de animales infectados con *H. polygyrus* ("*H. poly*") y las condiciones correspondientes sin infectar ("*naive*").

4.6.2 Durante la infección por *H. polygyrus*, aumenta la expresión de CD40L en las células T CD4⁺ de la CP

A continuación, se midió la disponibilidad de CD40L en la CP de los ratones infectados en comparación con los no infectados. Como se observa en la Figura 4.6.6, durante la infección por *H. polygyrus*, aumenta la expresión de CD40L en la superficie de las células T CD4⁺ presentes en la CP. Además, la detección del CD40L inducido por la infección fue menor en presencia del anticuerpo MR1 que del anticuerpo control, sugiriendo que el bloqueo de CD40L fue efectivo; el anticuerpo utilizado para la detección de CD40L en la citometría de flujo es de la misma clona que la del anticuerpo inyectado. Los niveles de CD40L total fueron similares en las 4 condiciones ensayadas, sugiriendo que la infección causa la traslocación de CD40L a la superficie celular, más que cambios en la síntesis de la proteína, y que, como se esperaría, el bloqueo con anticuerpos afecta principal o solamente al CD40L expuesto en superficie celular. Por otro lado, la infección por *H. polygyrus* promovió la expresión de MHCII en los LPM, pero no en los CPM ni en los SPM, que expresan niveles de MHCII altos ya en condiciones basales. Si bien aún luego del aumento inducido por la infección los niveles de MHCII en LPM son bastante inferiores a los de CPM y SPM, el aumento mencionado sugiere que los LPM podrían presentar antígenos a las células T CD4⁺ durante la infección, y por lo tanto recibir señales de CD40L en dicho contexto.

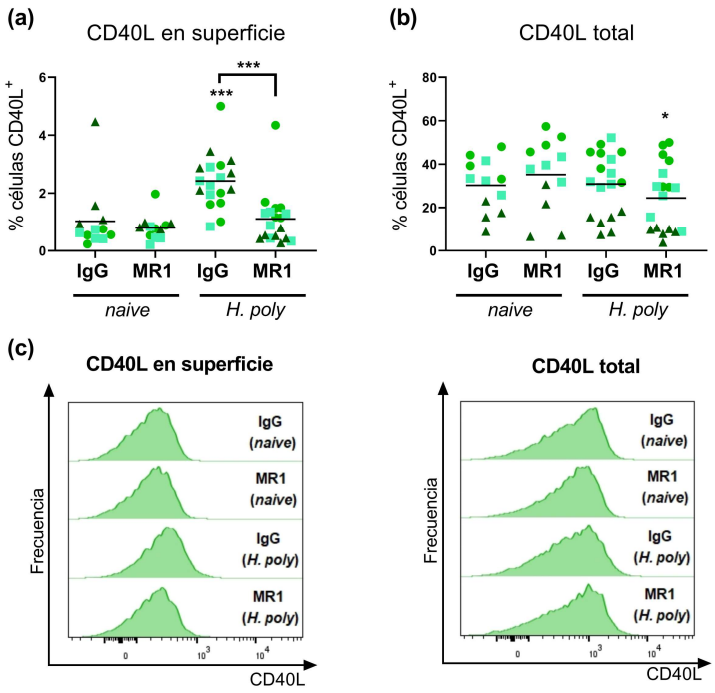


Figura 4.6.6. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.6.6. Durante la infección por *H. polygyrus* aumenta la expresión de CD40L en la superficie de las células T CD4⁺ de la CP. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se obtuvieron muestras de la CP y se cuantificó la expresión de CD40L en superficie (a) y total (b) en las células T CD4⁺ por citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como histogramas representativos para todas las condiciones (c). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a tres experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones de animales infectados con *H. polygyrus* (“*H. poly*”) y las condiciones correspondientes sin infectar (“*naive*”).

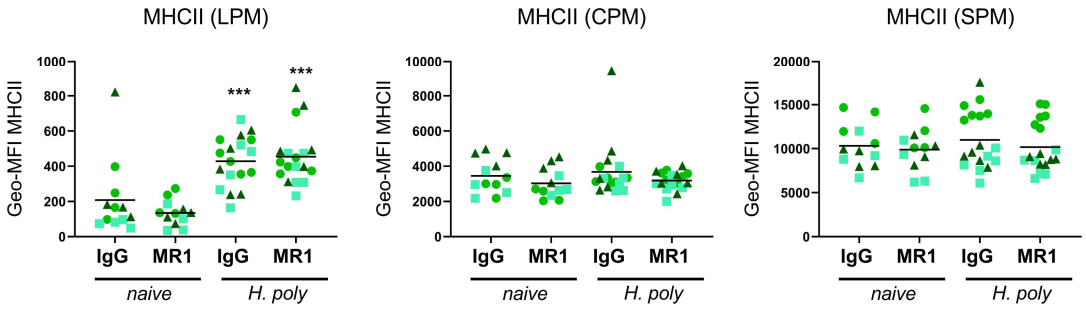


Figura 4.6.7. Durante la infección por *H. polygyrus* aumenta la expresión de MHCII en la superficie de los LPM. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se obtuvieron muestras de la CP y se cuantificó la expresión de MHCII en los macrófagos peritoneales por citometría de flujo. Se muestran datos de tres experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde) y el valor promedio general representados en media geométrica de fluorescencia (Geo-MFI). Cada punto representa el dato de un ratón. El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones de animales infectados con *H. polygyrus* (“*H. poly*”) y las condiciones correspondientes sin infectar (“*naive*”).

4.6.3 El bloqueo de CD40L durante la infección por *H. polygyrus* potencia las respuestas de los macrófagos de la CP

Con base en la verificación del aumento de la disponibilidad de CD40L en la CP de los ratones infectados con *H. polygyrus*, se estudió su impacto en la expresión de RELM-α e Ym1 en los LPM, CPM y SPM (Figura 4.6.8). Se observó que la infección indujo aumento en la expresión de RELM-α en los tres tipos de macrófagos analizados, siendo el efecto considerablemente menor en los LPM que en los CPM

y SPM. No obstante, la expresión de RELM-α no se vio afectada por el bloqueo de CD40L. Además, se observó que durante la infección aumenta la expresión de Ym1 tanto en LPM como en CPM y SPM, y que en presencia del MR1 se potencia de manera significativa su expresión en los tres tipos celulares, en comparación con el anticuerpo control. Por otro lado, también se midió la producción de RELM-α e Ym1 en el fluido de la CP (Figura 4.6.8d-e), y aunque se observó producción de ambos marcadores en respuesta a la infección, no se detectó que el MR1 afectara esta respuesta. Esto probablemente se deba a que esta medida refleja la producción total de RELM-α e Ym1, independientemente de las células que los producen. Cabe mencionar que otros tipos celulares, como neutrófilos y eosinófilos, son capaces de expresar estos marcadores en determinados contextos (86,275).

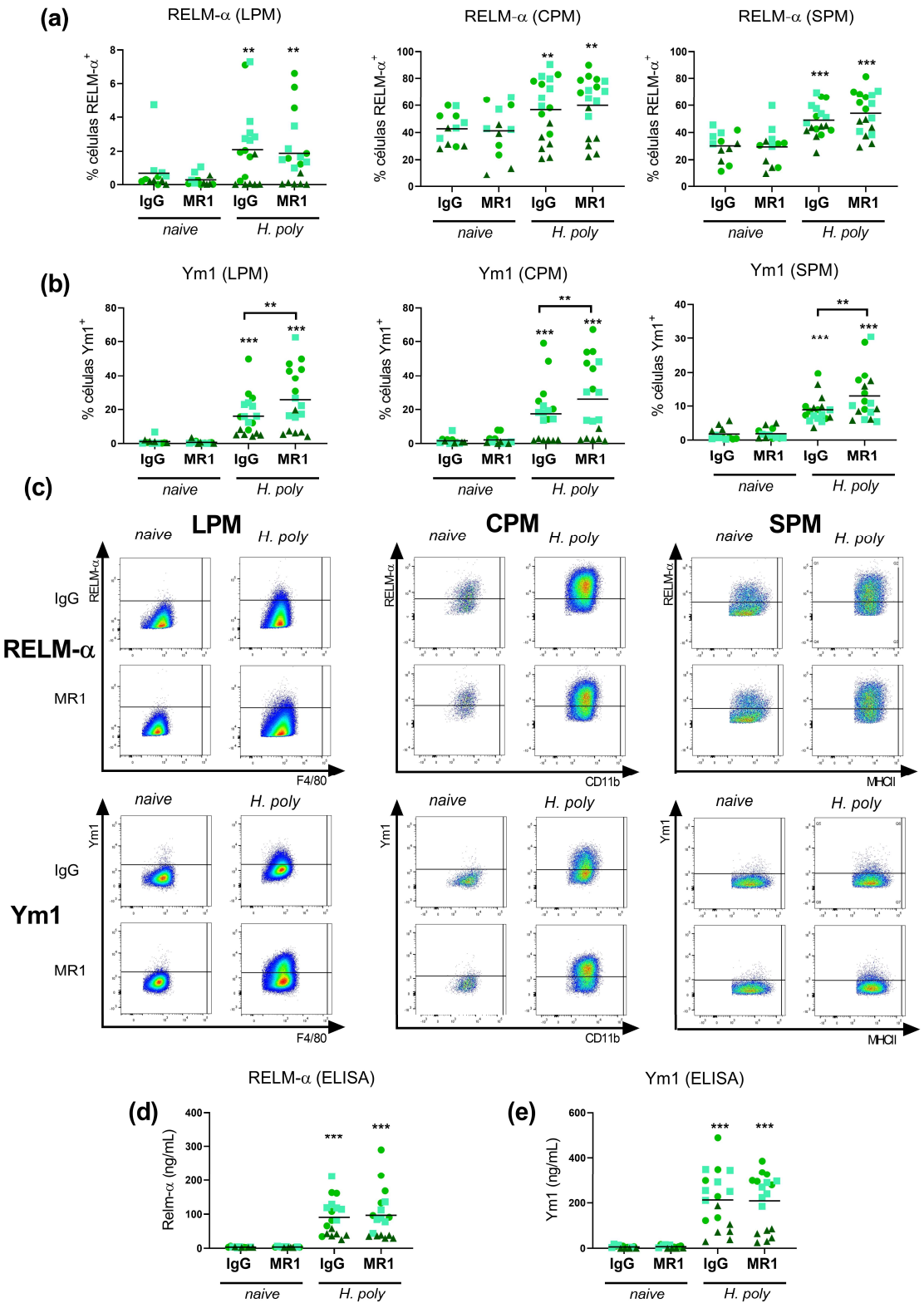


Figura 4.6.8. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.6.8. El bloqueo de CD40L potencia la expresión de Ym1 en los macrófagos de la CP durante la infección por *H. polygyrus*. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se analizó la expresión de RELM-α (a) e Ym1 (b) en los LPM, CPM y SPM por citometría de flujo, definidos como en la Figura 3.9 del capítulo de Materiales y Métodos. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos (c). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes, excepto para RELM-α que se tomaron como referencia los ratones controles sin infectar. Además, se cuantificó la producción de RELM-α (d) e Ym1 (e) en el fluido del primer mililitro de lavado peritoneal por ELISA. Se muestran datos de tres experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones de animales infectados con *H. polygyrus* ("*H. poly*") y las condiciones correspondientes sin infectar ("*naive*").

Posteriormente, se analizó cómo el CD40L en el contexto de la infección afecta la proliferación de los macrófagos de la CP (Figura 4.6.9). Se observó que, durante la infección, aumenta la proliferación principalmente de los LPM, y en presencia del anticuerpo MR1, esta respuesta se ve potenciada. En los CPM y SPM, se observó una respuesta proliferativa muy leve y variable entre experimentos, que no se vio afectada por la presencia del anticuerpo bloqueante de CD40L.

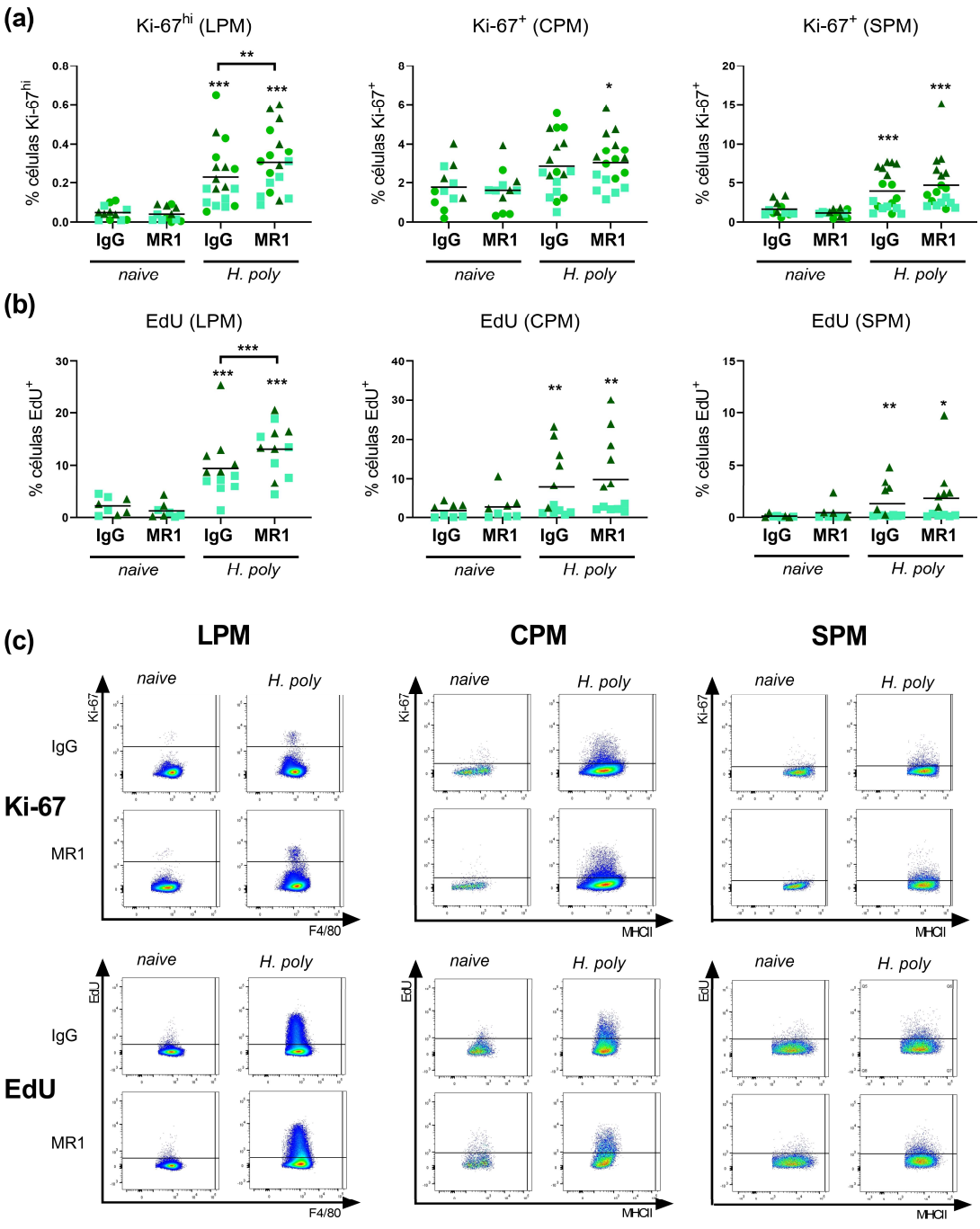


Figura 4.6.9. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.6.9. El bloqueo de CD40L potencia la proliferación de los LPM durante la infección por *H. polygyrus*. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se analizó la proliferación de los LPM, CPM y SPM por la expresión de Ki-67 (a) o incorporación de EdU (b) mediante citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos (c). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Se muestran datos de 2-3 experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones de animales infectados con *H. polygyrus* ("*H. poly"*) y las condiciones correspondientes sin infectar ("*naive"*).

Por lo tanto, dado que el bloqueo de CD40L potencia algunas de las respuestas de los macrófagos de la CP durante la infección por *H. polygyrus*, estos resultados sugieren que el CD40L probablemente presentado por células $CD4^+$ en un contexto específico de antígeno, modula negativamente aspectos de la respuesta de los macrófagos a la IL-4 (y/o la IL-13) en el contexto de la infección.

4.6.4 El bloqueo de CD40L durante la infección por *H. polygyrus* no afecta la proliferación de las células de Kupffer

Como se mencionó anteriormente, durante la infección por *H. polygyrus* se ha descrito la presencia de células T CD4+ potencialmente productoras de IL-4 a nivel sistémico, incluyendo el hígado (49). Además, considerando que los antígenos del parásito podrían llegar al hígado desde el intestino a través de la circulación portal hepática, se podría postular que, durante la infección por *H. polygyrus*, probablemente hay presentación de antígeno en el hígado. Por lo tanto, utilizando el sistema descrito en la Figura 4.6.1, se analizó si el bloqueo de CD40L modifica las respuestas de las KC a la infección por *H. polygyrus*.

En primer lugar, se estudiaron algunas de las células $CD45^+$ presentes en la fracción no parenquimal hepática mediante un análisis multidimensional, generando UMAPs (Figura 4.6.10). Si bien los tipos celulares identificados no son numerosos, en el grupo de animales infectados en ausencia del anticuerpo bloqueante de CD40L, se observó un aumento en la frecuencia de eosinófilos y monocitos en comparación con los no infectados. Además, se observó un claro aumento en la frecuencia de un tipo celular no definido, cuyo *cluster* se ubica cerca de uno de los *clusters* correspondientes a los monocitos, lo que sugiere que podría tratarse de una célula intermediaria en la diferenciación de monocito a macrófago. También se

observó un incremento en la frecuencia de uno o más tipos celulares en *clusters* distantes de los definidos, cuya identidad es difícil de predecir.

Por otro lado, en relación con el efecto del anticuerpo MR1, tanto en animales *naïve* como infectados, no se observó que la presencia del anticuerpo modifique las frecuencias ni las densidades de las poblaciones analizadas.

Además, se analizaron de forma cuantitativa los números de células totales en la fracción no parenquimal del hígado (Figura 4.6.11). Se observó un aumento en las células $CD45^+$ durante la infección, principalmente debido a un incremento en el reclutamiento de eosinófilos, monocitos, células B y células T $CD4^+$, no afectado por el bloqueo de CD40L. En contraste, no se observó un aumento en los números de las células residentes, como las KC y las LSEC en respuesta a la infección.

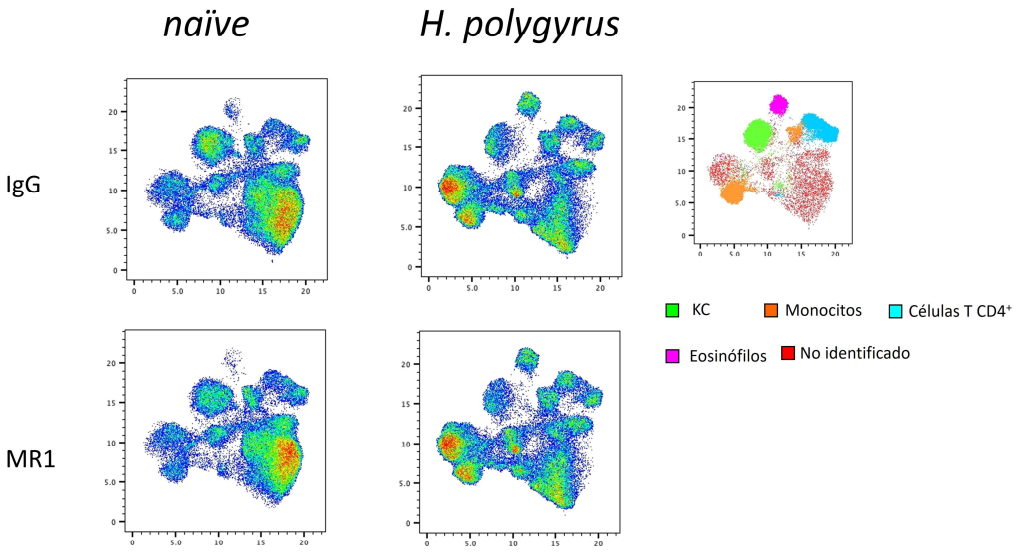


Figura 4.6.10. El análisis multidimensional de algunos de los tipos celulares presentes en el hígado no revela efectos del bloqueo de CD40L en ratones infectados con *H. polygyrus*. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se obtuvieron muestras de hígado, que fueron procesadas para obtener la fracción celular no parenquimal y se analizaron los distintos tipos de células presentes dentro de la población $CD45^+$ por citometría de flujo. Se muestran UMAPs para cada condición dentro del total de células vivas detectadas en la citometría generados utilizando los parámetros FSC, SSC, CD11b, F4/80, Ly-6C, Siglec-F y CD4. Cada diagrama fue generado a partir de un concatenado de muestras de los ratones individuales de cada grupo, para un experimento representativo.

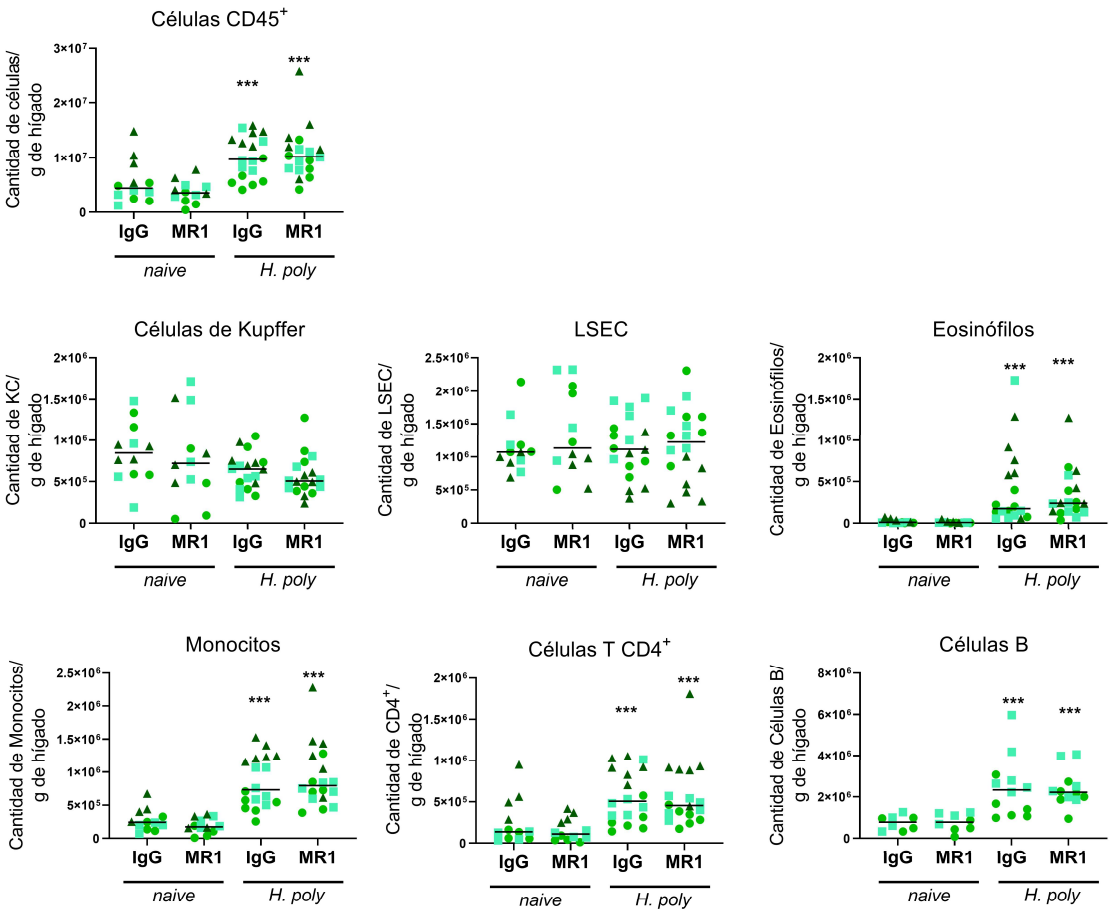


Figura 4.6.11. El bloqueo de CD40L no altera el reclutamiento de células en el hígado inducido por la infección *H. polygyrus*. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. y se obtuvieron muestras de hígado, que fueron procesadas para obtener la fracción celular no parenquimal. Se determinó la cantidad de células CD45⁺, así como la presencia de diferentes tipos celulares mediante citometría de flujo (definidas como en la Figura 3.5 de Materiales y Métodos con el agregado de marcadores para células T CD4+ (CD4), eosinófilos (Siglec-F), células B (CD19) y monocitos (Ly-6C)). Se muestran los resultados en números absolutos, calculados a partir de los porcentajes de células obtenidos en la citometría de flujo y el conteo inicial de células. Los datos corresponden a tres experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones de animales infectados con *H. polygyrus* ("*H. poly*") y las condiciones correspondientes sin infectar ("*naive*").

También se midió la expresión de CD40L, tanto de superficie celular como total, en las células T CD4⁺ detectadas en la fracción no parenquimal del hígado. A diferencia de lo que se observó en la CP, en el hígado no se evidenció un incremento significativo en la expresión de CD40L de superficie en las células T CD4⁺ los animales infectados en comparación con los controles no infectados (Figura 4.6.12).

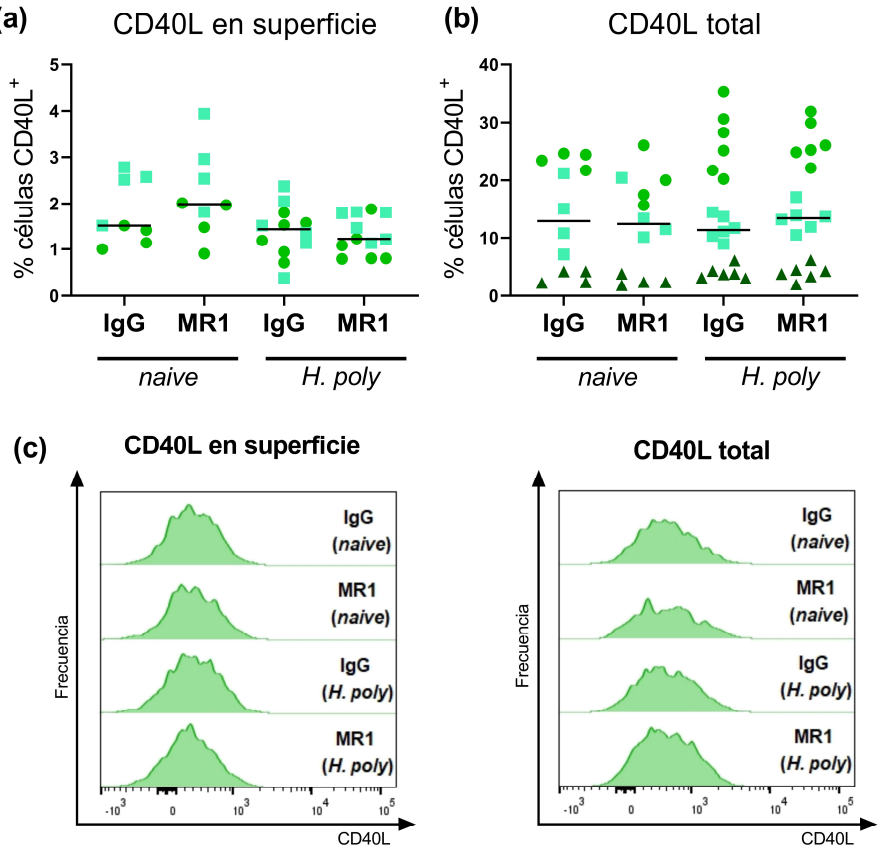


Figura 4.6.12. Durante la infección por *H. polygyrus* no se modifica la expresión de CD40L en las células T CD4⁺ hepáticas. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se obtuvo la fracción no parenquimal hepática y se determinó la expresión de CD40L en superficie (a) y total (b) de las células T CD4⁺ del hígado. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como histogramas representativos para todas las condiciones (c). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Los datos corresponden a tres experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos s.

Finalmente, se analizó si el bloqueo de CD40L durante la infección por *H. polygyrus* afecta la proliferación de las KC. Como se observa en la Figura 4.6.13, durante la infección se evidenció un aumento en la proliferación de las KC, detectado solamente por la incorporación de EdU, que no fue alterada por el bloqueo de CD40L.

Por otro lado, también se midió la presencia de RELM-α y Ym1 en las KC, pero no se detectó ninguno de estos marcadores en respuesta a la infección (datos no mostrados).

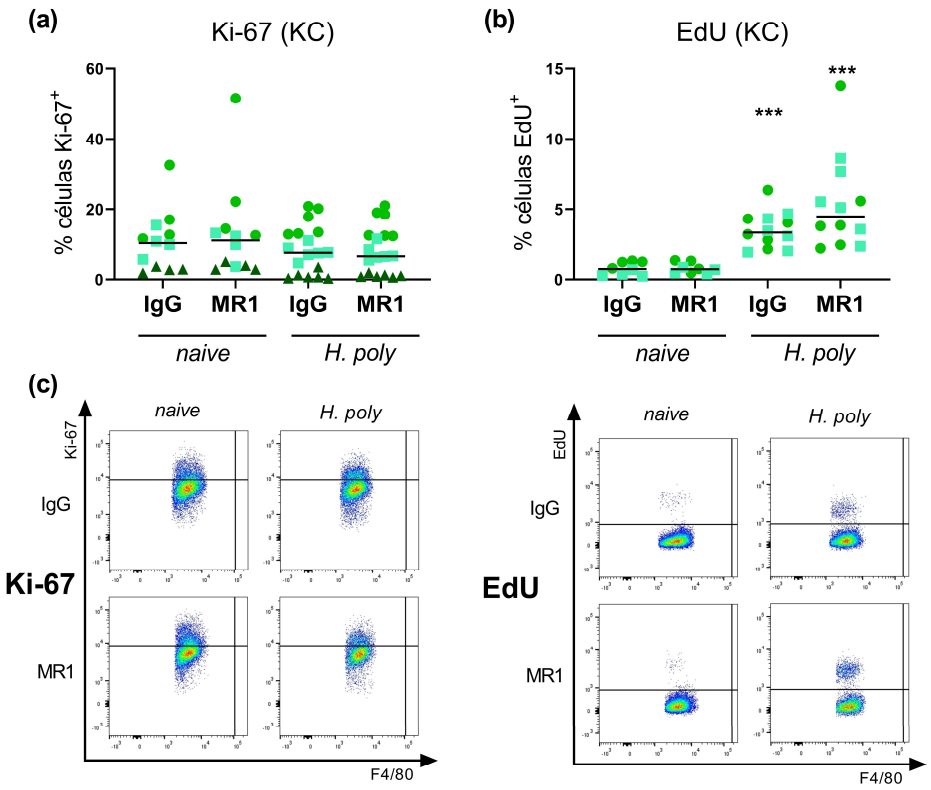


Figura 4.6.13. El bloqueo de CD40L no modifica la proliferación de las KC durante la infección por *H. polygyrus*. Se infectaron ratones C57BL/6 WT como se describe en la Figura 4.6.1. Se obtuvo la fracción no parenquimal hepática y se determinó la proliferación de las KC por la expresión de Ki-67 (a) o incorporación de EdU (b) mediante citometría de flujo. Se muestran datos en términos de porcentajes de células positivas para cada ratón y los promedios correspondientes, así como *dot plots* representativos (c). Los umbrales de detección se delimitaron con los controles de fluorescencia FMO correspondientes. Se muestran datos de 2-3 experimentos independientes (en distintas formas y tonalidades de verde). El análisis estadístico se realizó con el test paramétrico de dos vías detallado en Materiales y Métodos. Los asteriscos que no están unidos por líneas indican diferencias entre las condiciones de animales infectados con *H. polygyrus* ("*H. poly*") y las condiciones correspondientes sin infectar ("*naive*").

En resumen, los resultados obtenidos en el hígado sugieren que la falta de potenciación en la expresión de CD40L en el sitio lleva a una situación similar a la observada durante el estudio del CD40L endógeno (descrito en la Sección 2 del capítulo de Resultados), en la cual el CD40L presente no modifica la proliferación de las KC en respuesta a la infección.

4.7 Resultados 7: Búsqueda del estímulo faltante para la proliferación *in vitro* de los macrófagos de cavidad peritoneal en respuesta a IL-4

Como se mencionó previamente, y se mostró en el contexto de resultados presentados en las Secciones 1, 2 y 3, la IL-4 produce proliferación de macrófagos solamente cuando es administrada *in vivo*. Por el contrario, en cultivos de células totales de la CP estimulados *in vitro* con IL-4, no se ha evidenciado proliferación significativa de los macrófagos (77). Este contraste sugiere que en dichos cultivos hace falta algún estímulo adicional que está presente *in vivo*. Conceptualmente, ese estímulo adicional podría ser un factor soluble presente en el fluido de la cavidad *in vivo*, o una señal de contacto dada por las células mesoteliales que recubren la CP, ausentes en los cultivos. Otra posibilidad es que condiciones fisicoquímicas de la cavidad importantes para la respuesta de los macrófagos no sean correctamente imitadas en los cultivos de células hechos en condiciones convencionales. En la Sección 5 se evaluó la posibilidad de que el CD40L fuera el estímulo faltante para la proliferación *in vitro* de los macrófagos de la CP en respuesta a la IL-4, obteniéndose resultados negativos.

Por lo tanto, en la última sección de este trabajo, se evaluaron algunas de las opciones posibles como estímulos faltantes para la proliferación de los macrófagos en cultivo en respuesta a la IL-4 independientemente de CD40L.

4.7.1 El fluido obtenido de la CP no habilita la proliferación de macrófagos peritoneales *in vitro* en respuesta a la IL-4

Se evaluó si el estímulo faltante para inducir la proliferación de macrófagos en cultivo podría corresponder a alguna molécula soluble presente en la CP. Se consideraron las posibilidades de que dicho estímulo estuviera presente en forma constitutiva, o de que en cambio fuera producido en respuesta a la administración de IL-4 *in vivo*. Para evaluar esto, se obtuvo el fluido de la CP (FCP) a partir de *pooles* de ratones *naïve*, así como de ratones inyectados con IL-4c 48 horas antes (FCP(IL-4c)). Dichos fluidos se utilizaron para estimular células totales de la CP, provenientes de ratones *naïve* o previamente tratados con medio tioglicolato, en presencia o ausencia de IL-4. Como se observa en la Figura 4.7.1, los macrófagos de la CP basal no respondieron con proliferación a ninguno de los fluidos generados, tanto en presencia como en ausencia de IL-4. En cambio, en los cultivos de CP proveniente de contexto inflamatorio, la IL-4 pareció dar lugar a una leve proliferación de los IMacs por sí sola, un fenómeno que fue observado en

experimentos previos no mostrados, si bien de manera poco reproducible. Por otro lado, el FCP(IL-4c) también pareció generar un aumento moderado en la proliferación de los IMacs, incluso en ausencia de IL-4, lo que posiblemente se deba a la presencia de IL-4 remanente en la CP de los ratones de los cuales se obtuvo el fluido. Sin embargo, el FCP (obtenido de ratones no inyectados con IL-4c) pareció potenciar levemente la débil proliferación de los IMacs observada en la presencia de IL-4, lo que sugería que dicho fluido podría contener el estímulo limitante para la respuesta de estos macrófagos a la IL-4 en cultivo.

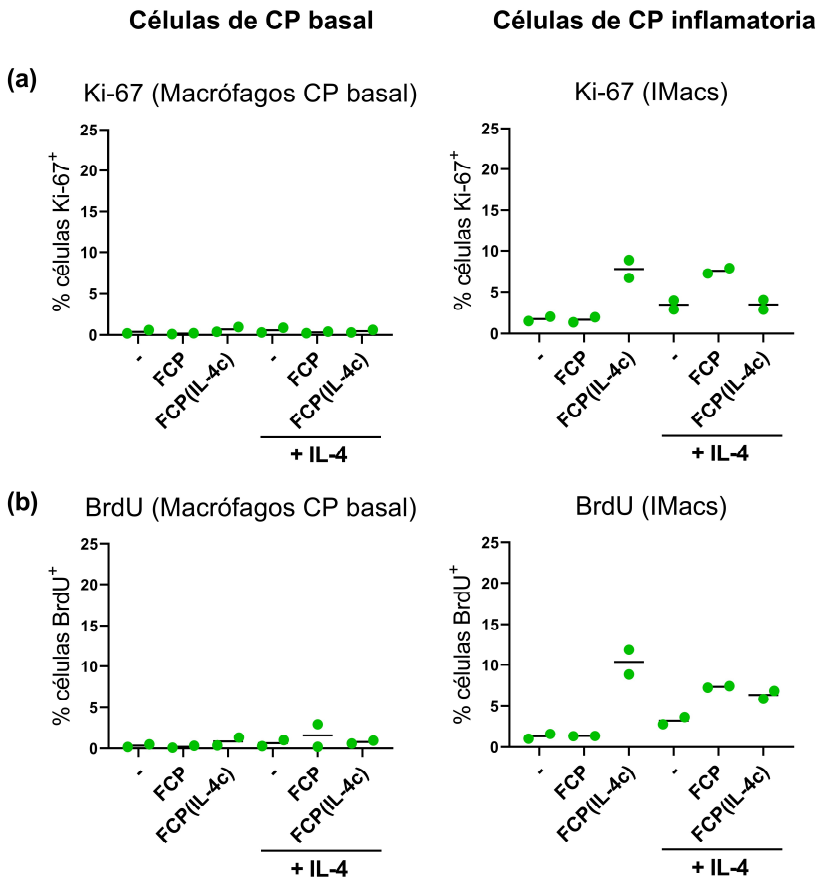


Figura 4.7.1. La suplementación de cultivos de células totales de la CP con fluidos de la CP no habilita a los macrófagos presentes en condiciones basales a proliferar en respuesta a IL-4. Se cultivaron células totales de la CP de ratones C57BL/6 WT vírgenes ("Células de CP basal"), así como células obtenidas 72 horas después de la inyección vía i.p. con medio tioglicolato al 4 % m/v ("Células de CP inflamatoria"). Se estimularon las células con IL-4 y/o el fluido de la CP de ratones WT vírgenes ("FCP") o inyectados con IL-4c 48 horas antes ("FCP(IL-4c)"). Luego de 48 horas en cultivo se analizó la proliferación de los macrófagos por expresión de Ki-67 (a) o incorporación de BrdU (b) mediante citometría de flujo. Los datos se muestran como porcentajes de células positivas para cada muestra, junto con los promedios correspondientes. Los datos corresponden a un único experimento.

Dado que los niveles de proliferación en los macrófagos fueron muy bajos, se consideró que el estímulo en cuestión podría estar demasiado diluido en los fluidos, lo que impediría la visualización de una respuesta más pronunciada. Por lo tanto, se optó por concentrar el FCP, cuyo resultado había sido el más prometedor, y evaluar, además, diferentes temperaturas de conservación requeridas por las técnicas de concentración utilizadas. Una vez generados los fluidos, se estimularon células de la CP en contexto inflamatorio con los FCP concentrados, tanto en presencia como en ausencia de IL-4, y se evaluó la proliferación de los IMacs en comparación al control positivo M-CSF. Como se observa en la Figura 4.5.2, ninguno de los FCP en sus versiones concentradas potenció la proliferación de macrófagos de forma superior a la que mostro la IL-4 por sí sola. Por lo tanto, esto sugiere que la falta de efecto del FCP no se debe a una dilución excesiva, sino a que dicho fluido no contiene el estímulo necesario para la proliferación *in vitro* de los macrófagos en respuesta a la IL-4.

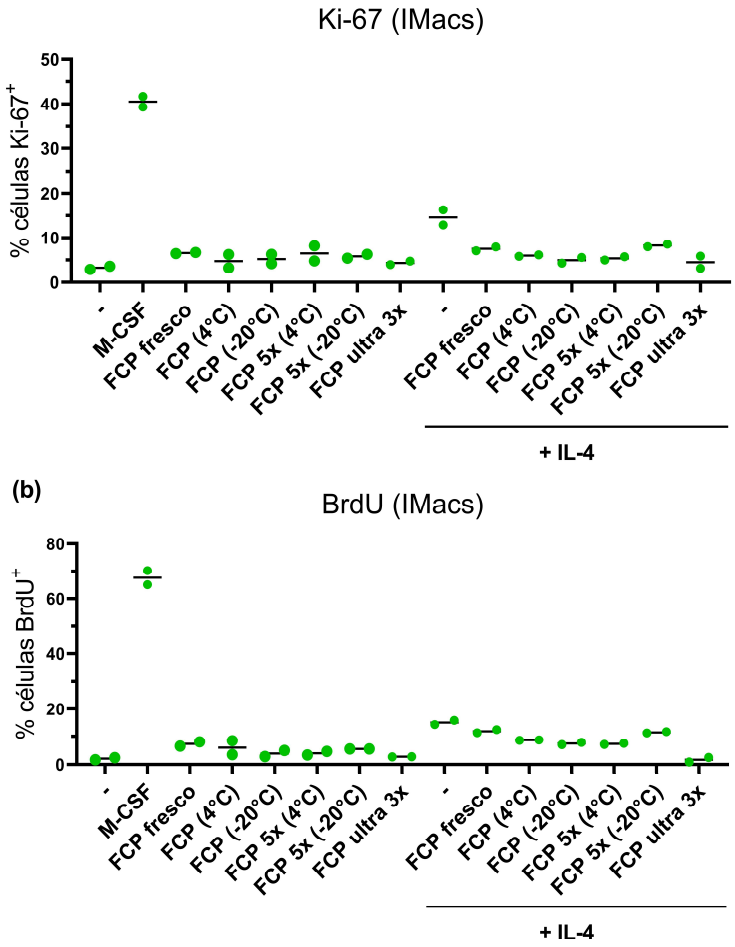


Figura 4.7.2. Ver leyenda en la siguiente página

Figura 4.7.2. La suplementación de cultivos de células totales de la CP con el fluido de la CP de ratones vírgenes no habilita a los macrófagos presentes en condiciones inflamatorias a proliferar en respuesta a IL-4. Se cultivaron células totales de la CP de ratones C57BL/6 WT obtenidas 72 horas después de la inyección vía i.p. con medio tioglicolato al 4 % m/v. Se estimularon las células con IL-4 y/o el fluido de la CP de ratones WT vírgenes ("FCP") fresco o conservado por 24 horas a 4 o -20 ° C, así como concentrado 5x utilizando filtros de centrífuga de 5000 KDa. Además, se ultracentrifugó el FCP por 1 hora a 100 Kg y se tomó el producto concentrado en medio completo de forma de llegar a una concentración 3x respecto de la inicial. Se utilizó como control positivo la estimulación con M-CSF. Luego de 48 horas en cultivo con los estímulos, se midió la proliferación de los macrófagos inflamatorios por expresión de Ki-67 (a) o incorporación de BrdU (b) por citometría de flujo. Los datos se presentan como porcentajes de células positivas para cada muestra, junto con los promedios correspondientes. Se muestran resultados para un único experimento.

4.7.2 En condiciones de hipoxia, la IL-4 no promueve la proliferación de los macrófagos de la CP en cultivo

En base a los resultados negativos descritos, se planteó la posibilidad de que el factor que impide la proliferación de macrófagos *in vitro* en respuesta a la IL-4 sea una alta tensión de oxígeno, ya que en las condiciones usuales de cultivo la tensión de oxígeno es mayor que en los tejidos (266). Para abordar esto, se realizaron cultivos de células de CP basal y se estimularon *in vitro* con IL-4, manteniendo las células por 48 horas es un ambiente hipóxico. En primer lugar, se evaluaron condiciones de hipoxia severa (1 % v/v O_2) (Figura 4.7.3), observándose que, bajo estas condiciones, la IL-4 no generó proliferación de macrófagos, y además anuló completamente la proliferación en respuesta al M-CSF. Además, la hipoxia severa, inhibió fuertemente la expresión de RELM-α e Ym1 de los macrófagos en cultivo.

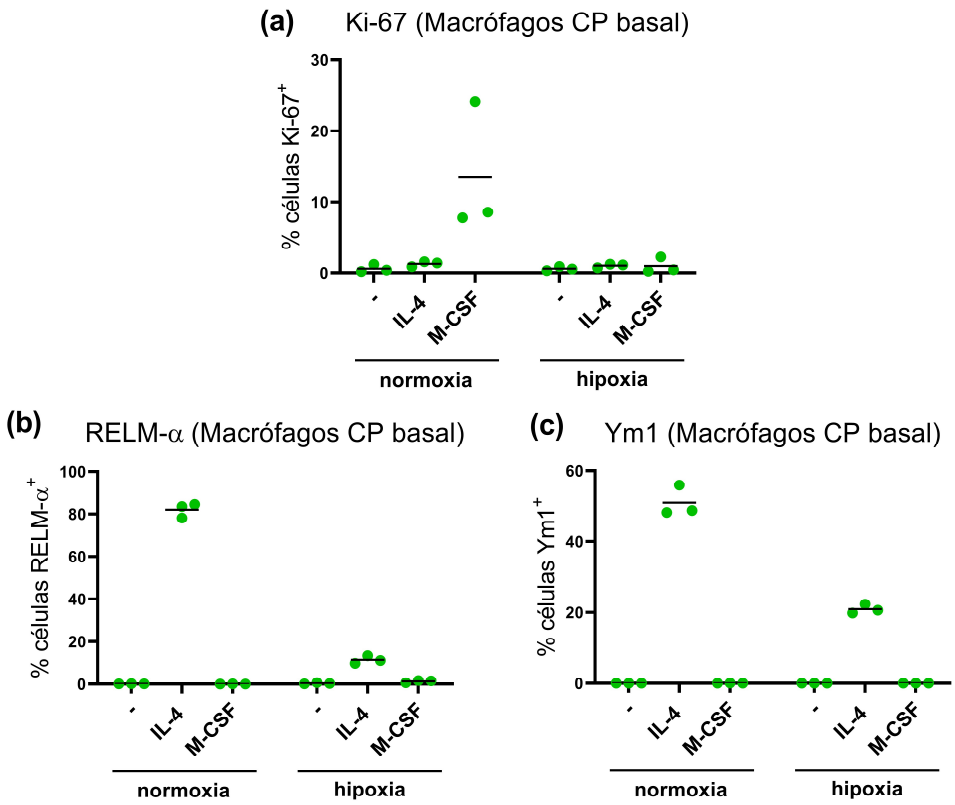


Figura 4.7.3. En condiciones de hipoxia severa in vitro, los macrófagos de la CP basal no proliferan y presentan una menor inducción de la expresión de marcadores M(IL-4). Se cultivaron células totales de la CP de ratones C57BL/6 WT y se estimularon con IL-4 o M-CSF en condiciones normales de cultivo ("normoxia") o en 1 % v/v de O_2 ("hipoxia"). Pasadas 48 horas desde la estimulación se analizó la proliferación de los macrófagos por expresión de Ki-67 (a) y su polarización por expresión de RELM-α (b) e Ym1 (c) por citometría de flujo. Se muestran los resultados como porcentajes de células positivas para cada muestra, junto con los promedios correspondientes. Los datos corresponden a un único experimento.

Finalmente, se estudió si en condiciones de hipoxia moderada (7 % v/v O_2), los macrófagos de CP en condiciones basales y/o los IMacs responden a la IL-4 con proliferación, y como repercute este ambiente en la polarización M(IL-4) de estas células. Como se muestra la Figura 4.7.4, en estas condiciones no se observó proliferación inducida por la IL-4 en los macrófagos basales ni en los IMacs. Además, al contrario de lo observado en condiciones de hipoxia severa, la hipoxia moderada no anuló la proliferación en respuesta al M-CSF.

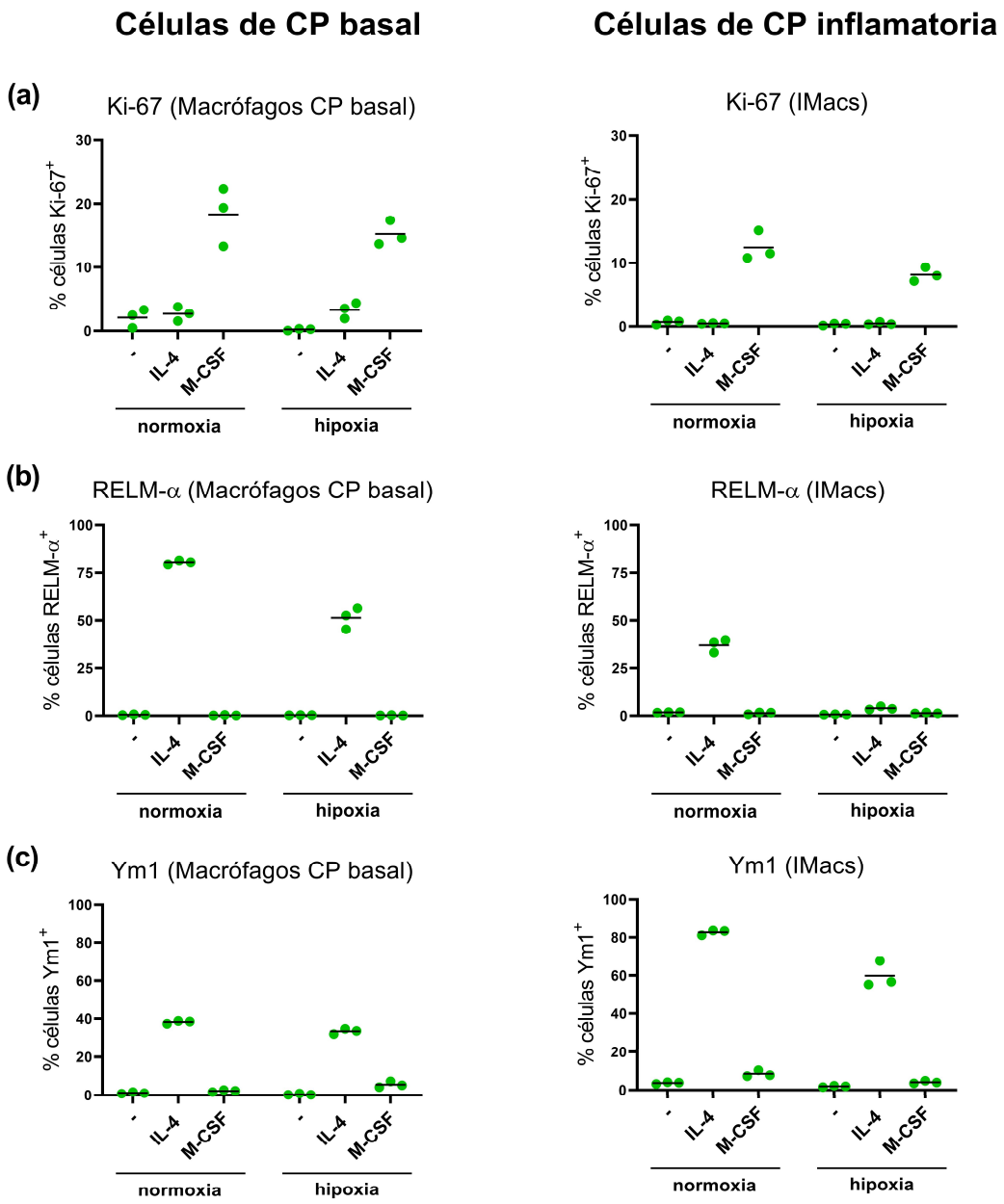


Figura 4.7.4. En condiciones de hipoxia moderada in vitro, los macrófagos de la CP basal e inflamatoria no proliferan en respuesta a IL-4 y presentan una menor inducción de la expresión de RELM-α. Se cultivaron células totales de la CP de ratones C57BL/6 WT vírgenes ("Células de CP basal"), así como células obtenidas 72 horas después de la inyección vía i.p. con medio tioglicolato al 4 % m/v ("Células de CP inflamatoria"). Se estimularon las células con IL-4 o M-CSF en condiciones normales de cultivo ("normoxia") o en 7 % v/v O_2 ("hipoxia"). Pasadas 48 horas desde la estimulación se analizó la proliferación de los macrófagos por expresión de Ki-67 (a) y su polarización por expresión de RELM-α (b) e Ym1 (c) por citometría de flujo. Se muestran los resultados como porcentajes de células positivas para cada muestra, junto con los promedios correspondientes. Los datos corresponden a un único experimento.

En cuanto a la polarización M(IL-4) de los macrófagos, en los macrófagos de CP basal el efecto de la hipoxia moderada fue mínimo, afectando únicamente la expresión de RELM-α, sin modificar la de Ym1. En cambio, en los IMacs, la hipoxia moderada inhibió fuertemente la expresión de RELM-α y, en menor medida, la de Ym1.

En resumen, la alta tensión de oxígeno en los cultivos no es la limitante para la proliferación de los macrófagos peritoneales en cultivo en respuesta a la IL-4, al menos como único factor en juego.

5 Discusión

5.1 Impacto del CD40L sobre las respuestas de los macrófagos a la IL-4

La parte central de esta tesis surge a raíz de la interrogante sobre cómo distintos agonistas de CD40 repercuten en las respuestas de los macrófagos peritoneales y las KC frente a la IL-4. En ese sentido, se estudió la influencia sobre las respuestas mencionadas del CD40L endógeno presente en condiciones basales e inflamatorias estériles, de los agonistas exógenos solubles de CD40, y del CD40L en un contexto de infección.

5.1.1 CD40L endógeno en condiciones basales

En la CP en condiciones basales, se detectó CD40L únicamente en las células T $CD4^+$ (Figura 4.2.1). En las células T $CD4^+$ V, el CD40L se encuentra mayoritariamente en la superficie celular, mientras que en las T $CD4^+$ ME está presente mayoritariamente de forma intracelular; las células T $CD4^+$ MC presentan un patrón intermedio entre ambas (Figura 4.2.2). Entonces, el CD40L endógeno basal se compone de CD40L constitutivo, es decir, el expresado por las células T $CD4^+$ V y por el CD40L presente en las células T $CD4^+$ MC y ME, que razonamos fue inducido por eventos de presentación de antígeno que ocurren en condiciones basales como consecuencia de la exposición a antígenos de patógenos no excluidos por las condiciones de crianza de los animales, o con menor probabilidad, de la microbiota o de origen dietario si se dieran respuestas anormales a tales antígenos, normalmente tolerados.

Por otro lado, en todas las células T $CD4^+$ de la CP, la expresión de CD40L en la superficie celular está fuertemente regulada por la presencia de CD40, como evidencian las diferencias observadas entre ratones WT y CD40 KO (Figura 4.2.2). Este hallazgo extiende lo reportado por Lesley y colaboradores en órganos linfoides (220). Sin embargo, a diferencia de las observaciones que indican que el CD40L es indetectable en la superficie de las células T $CD4^+$ V en órganos linfoides secundarios de ratones WT ((220) y mediciones propias no mostradas), aproximadamente un 15 % de las células T $CD4^+$ V de la CP en ratones WT presentan CD40L en su superficie (Figura 4.2.2). Según lo observado por Lesley y colaboradores, la regulación del CD40L mediada por CD40 se pierde cuando las células se encuentran en baja densidad, lo que reduce la probabilidad de

interacción entre CD40 y CD40L. Por lo tanto, el nivel más alto de CD40L en la superficie de las células T $CD4^+$ V WT en la CP, en comparación con los órganos linfoides, podría reflejar una menor frecuencia de encuentros con células que expresan CD40 en el entorno de la cavidad.

Los resultados obtenidos utilizando un sistema de doble transferencia de células mostraron que los macrófagos de la CP pueden regular el CD40L endógeno basal disponible en la superficie celular (Figura 4.2.7). Como se mencionó previamente, las células no B son importantes para el control del CD40L superficial dependiente de CD40 en los órganos linfoides (220). Estas observaciones, en combinación con los datos generados en este trabajo, sugieren que los macrófagos, y posiblemente también las DC, podrían desempeñar un papel relevante en la regulación del CD40L endógeno basal tanto en sitios linfoides como no linfoides. Además, estos resultados aportan evidencia de interacciones entre macrófagos y células T $CD4^+$ V en la CP en condiciones homeostáticas.

Aunque el CD40L endógeno basal interactúa con los macrófagos de la CP a través de CD40, resultados obtenidos empleando distintos sistemas mostraron que dicho CD40L no afecta directamente las respuestas de los macrófagos de la CP frente a la IL-4, *in vitro* (Figuras 4.1.3, 4.1.4 y 4.1.6) ni *in vivo* (4.2.8, 4.2.9, 4.2.12, 4.2.13, 4.2.19 y 4.2.20), aún en condiciones de alta disponibilidad de dicho ligando (Figura 4.1.7). Cabe aclarar que las intervenciones realizadas (bloqueo de CD40L) afectan a la totalidad del CD40L endógeno basal (o a su posibilidad de señalizar por CD40), lo que incluye entonces a potenciales efectos tanto del CD40L constitutivo, así como de CD40L inducido por posibles eventos de presentación de antígeno que ocurran en condiciones basales. De todas formas, los resultados negativos obtenidos permiten concluir que el CD40L constitutivo, que debe corresponder a la mayor parte del CD40L disponible en condiciones basales, no ejerce un efecto sobre las respuestas de los macrófagos a la IL-4. Esta ausencia de efecto podría explicarse porque la expresión CD40L se ve algo disminuida por la IL-4 (Figuras 4.2.1 y 4.2.2). Sin embargo, el CD40L endógeno no parece afectar a los macrófagos peritoneales aún en ausencia de IL-4, como lo sugiere la ausencia de efectos del bloqueo del CD40L o la deficiencia del gen CD40 en términos de expresión basal de MHCII en los LPM y SPM (Figuras 4.2.10 y 4.2.13). Como se discutirá más adelante, es probable que la función del CD40L constitutivo no tenga que ver con modular las respuestas de los macrófagos, y que este tipo celular no sea el blanco principal del CD40L constitutivo.

En paralelo, se evaluó si las KC son sensibles al CD40L endógeno en condiciones basales, en términos de la proliferación inducida por la administración de IL-4.

Como se mencionó previamente, las KC están en contacto directo con la circulación sanguínea, en la cual, en ratones C57BL/6 adultos, aproximadamente el 20 % de las células T $CD4^+$ circulantes presentan un fenotipo V (276). Las células T $CD4^+$ V en sangre periférica expresan CD40L constitutivo en su superficie (220), por lo que es razonable considerar que las KC podrían entrar en contacto con este CD40L, que podría actuar como una señal tónica en contextos fisiológicos. Además, las KC también pueden estar expuestas al CD40L expresado por plaquetas, que constituye la principal fuente intravascular de CD40L y que se externaliza durante su activación (277). Sin embargo, los resultados obtenidos indicaron que el CD40L endógeno basal no influye en la proliferación de las KC en respuesta a IL-4 (Figura 4.2.11), de forma similar a lo observado en los macrófagos de la CP.

De forma complementaria, se estudió si el CD40L presente en un contexto inflamatorio estéril, como el inducido por la inyección intraperitoneal de medio tioglicolato, influye sobre las respuestas de los macrófagos peritoneales a la IL-4. Considerando que en un contexto inflamatorio probablemente se recluten células T efectoras, así como otras poblaciones celulares que expresan CD40 y que podrían regular la disponibilidad de CD40L, es posible que el CD40L presente en estas condiciones no sea equivalente al observado en estado basal. Sin embargo, los resultados descriptivos para el CD40L en este contexto inflamatorio no mostraron diferencias en la expresión total ni en superficie celular de CD40L en las células T $CD4^+$ totales en comparación con las células T $CD4^+$ totales en condiciones basales (Figura 4.3.2). Pese a esta falta de cambios aparente, dado que no se hizo una caracterización en términos de subtipos de células T $CD4^+$ (V, CM, EM), no es posible conocer si el CD40L presente en la superficie de las células T $CD4^+$ en la condición inflamatoria corresponde, como en las condiciones basales, mayoritariamente a CD40L constitutivo (expresado por células V) o hay una contribución importante de CD40L inducido por antígeno (expresado por células CM y/o EM). Más allá de esta falta de información, los resultados del bloqueo de CD40L *in vivo* indicaron que el CD40L endógeno presente en el contexto inflamatorio inducido por tioglicolato no afecta la proliferación de los IMacs ni la producción de Arginasa-1, marcador asociado a su polarización M(IL-4) (Figura 4.3.3). Cabe destacar que los IMacs presentaron niveles de CD40 más bajos que los LPM en condiciones basales (Figura 4.3.1), lo cual podría implicar que, aun si CD40L estuviera más disponible en contextos de inflamación que en el contexto basal, igualmente los IMacs serían poco sensibles a esta señal.

En suma, los resultados negativos obtenidos para los macrófagos de CP e hígado, junto con la observación reportada que el efecto de CD40L sobre la supervivencia de las células B autorreactivas es igual en células B que expresan y no expresan

CD40 presentes en el mismo ratón (220), sugieren que las células blanco del CD40L constitutivo (en el entendido que tales células deben existir) no son ni los macrófagos ni las células B. Sin embargo, la observación de que los macrófagos regulan negativamente al CD40L constitutivo de superficie celular sugiere que estas células, y posiblemente también las células B, podrían actuar como un amortiguador para la disponibilidad de CD40L constitutivo.

5.1.2 Agonistas exógenos solubles de CD40

Como se mostró en la Sección 5 del capítulo de Resultados, se evaluó el impacto de los agonistas exógenos de CD40 sobre las respuestas de los macrófagos de la CP a la IL-4. El agonista usado en los experimentos *in vitro*, el sCD40L, es prácticamente idéntico al CD40L liberado proteolíticamente por las células en contextos fisiológicos (178). Para los experimentos *in vivo*, el uso de sCD40L no resultó práctico, ya que, posiblemente a causa a su baja biodisponibilidad debida a su baja masa molecular (49.2 KDa la forma trimérica) (173) y consiguiente filtración renal, se requerían dosis muy elevadas para lograr un efecto (datos no mostrados). Por este motivo, se optó por utilizar un anticuerpo agonista de CD40. Existe una amplia variedad de anticuerpos agonistas de CD40 ya que son una herramienta de valor para la inmunoterapia contra el cáncer (183). Sin embargo, la administración de estos anticuerpos *in vivo* ha mostrado efectos adversos, entre los cuales se incluyen el síndrome de liberación de citoquinas, caracterizado por un aumento en los niveles circulantes de IL-6 y TNF-α, así como hepatotoxicidad, evidenciada por un incremento en las concentraciones de enzimas hepáticas en circulación (278). En base a estos antecedentes, el uso del anticuerpo agonista de CD40 requirió una etapa de puesta a punto, durante la cual se observaron anomalías en el número de células de la CP y daño hepático macroscópico, lo que sugiere efectos citotóxicos y hepatotóxicos, tal como era esperable a dosis elevadas (Figuras 4.5.3 y 4.5.5). En cambio, a dosis más bajas se registraron efectos adversos mínimos, por lo que éstas fueron seleccionadas para los experimentos posteriores.

La administración del anticuerpo agonista de CD40, además de inducir el esperado aumento en la expresión de MHCII, ICAM-1, CD80 y CD86 (Figuras 4.5.4 y 4.5.9), también provocó una marcada disminución en la expresión de F4/80 en los macrófagos residentes de la CP (Figura 4.5.6). Aunque no hay evidencia directa previa de que los agonistas de CD40 modulen la expresión de F4/80, se ha observado que la activación de CD40 en macrófagos puede inducir una reprogramación metabólica (262) y cambios fenotípicos hacia un perfil

proinflamatorio tipo M1 (279), lo que podría hipotéticamente impactar en la expresión de este marcador. Además, la IL-4 potenció la expresión de CD80 y MHCII (Figura 4.5.9), probablemente debido a su curioso pero bien establecido efecto de potenciar fuertemente la producción de IL-12 en DC, macrófagos y monocitos tras la ligación de CD40 (280–287). Razonamos que una producción exacerbada de IL-12 induciría IFN-γ de células T y NK, que a su vez potenciaría CD80 y MHCII en los macrófagos. Una posibilidad alternativa o complementaria, un tanto especulativa, es que los agonistas de CD40 induzcan una de-diferenciación de los LPM, que entonces pasen a expresar menores niveles de F4/80 y mayores niveles de MHCII.

Los agonistas de CD40 inhibieron la expresión de marcadores M(IL-4) en los macrófagos *in vitro* (Figura 4.5.1) e *in vivo* (Figura 4.5.7), en concordancia con el efecto previamente descrito de los agonistas de CD40 sobre los TAMs (262). Por otro lado, resultados, fuera del marco de esta tesis, obtenidos por I. González, demostraron que el efecto inhibitorio de los agonistas de CD40 *in vitro* se mantiene incluso en cultivos de macrófagos peritoneales purificados, lo que sugiere que al menos parte de dicho efecto se debe a una señalización directa sobre los macrófagos.

Al utilizar células totales de la CP provenientes de ratones CD40 KO se observó que el sCD40L es capaz de inhibir la expresión de RELM-α de manera independiente de CD40, si bien en forma más débil que en presencia del receptor (Figura 4.5.1b y resultados obtenidos por I. González). Por lo tanto, es concebible que el sCD40L actúe, además de por CD40, a través de receptores alternativos. En particular, la integrina CD11b/CD18, altamente expresada en macrófagos (261), ha sido implicada en la regulación negativa de la expresión de Arginasa-1 en macrófagos del tejido adiposo de ratones obesos (288).

El anticuerpo agonista de CD40 también inhibió la proliferación de los macrófagos de la CP en respuesta a la IL-4 (Figura 4.5.8), un efecto que solo pudo evidenciarse *in vivo*, debido a la ya mencionada ausencia de respuesta proliferativa de los macrófagos a la IL-4 en cultivo (Figura 4.5.2). Estos resultados no permiten asegurar que el efecto inhibitorio del agonista sobre la proliferación de los macrófagos se deba a la señalización directa por CD40, dado que la probable presencia de IFN-γ, capaz de inhibir la proliferación en respuesta a M-CSF (289), y potencialmente también la inducida por IL-4, podría contribuir al efecto observado. De estos resultados cabe, por otro lado, destacar que los macrófagos y las células B, al coexistir en un mismo pocillo de cultivo o en la CP, responden de manera cualitativamente diferente a la combinación de agonistas de CD40 e IL-4 en lo que respecta a la proliferación (Figuras 4.5.2 y 4.5.8). Esto indica que la falta de

agonistas de CD40 no es la causa por la cual los macrófagos en cultivo no proliferan en respuesta a IL-4.

5.1.3 CD40L en el contexto de infección por *H. polygyrus*

Como se ha descrito previamente, la infección oral de ratones con el nematodo gastrointestinal *H. polygyrus* conduce a la invasión de la submucosa duodenal, donde los parásitos completan su maduración. A pesar de que los gusanos permanecen restringidos al tracto gastrointestinal, hay una diseminación sistémica de células Th2, con una infiltración preferencial en la CP (49). A los nueve días post-infección, se detectó un aumento en la expresión de CD40L en la superficie de las células T $CD4^+$ de la CP (Figura 4.6.6), acompañado de un aumento en la expresión de MHCII en los LPM (Figura 4.6.7), lo que sugiere que estas células podrían estar presentando antígeno a las células T $CD4^+$ en este sitio. La fracción de células T $CD4^+$ de la CP que expresa CD40L por encima del nivel basal en respuesta a la infección es pequeña (Figura 4.6.6). Esto concuerda a un nivel general con lo reportado por Mohrs y colaboradores, quienes observaron que solo una fracción minoritaria de las células Th2 de la CP de ratones de dos semanas de infección expresan CD69, un marcador que se induce rápidamente tras la estimulación del TCR, y que constituye un buen indicador de activación aguda de células T (49,290). Aunque no resulta evidente que los antígenos del gusano, alojado en el intestino, deban alcanzar la CP en cantidades significativas, la presencia de células Th2 $CD69^+$ reportadas por Mohrs y colaboradores, así como las células T $CD4^+$ $CD40L^+$ observadas en los resultados de esta tesis, sugieren que efectivamente algunos antígenos del parásito llegan a la cavidad. Al mismo tiempo, los resultados mencionados apoyan la idea de que, *in vivo*, una fracción de células T $CD4^+$ específicas para *H. polygyrus* recibe estimulación antigénica a través del TCR mediante el reconocimiento de péptidos del parásito presentados en MHCII por APC de la CP.

A partir de las observaciones descritas, se bloqueó CD40L en el contexto de la infección, con el objetivo de investigar si el CD40L disponible en un contexto en el que existe interacción específica de antígeno impacta sobre las respuestas de los macrófagos peritoneales a la infección, y en particular aquellas respuestas parcial o totalmente dependientes de IL-4 o IL-13, como la proliferación y la expresión de marcadores M(IL-4) (61).

El análisis realizado, por un abordaje multidimensional (Figura 4.6.3) y por cuantificación convencional de los números de distintos tipos celulares en la cavidad (Figura 4.6.5), mostró con claridad cambios generados por la infección, que

se concentraron en las poblaciones del compartimento monocito-macrófago. Los datos sugirieron que la infección por *H. polygyrus* promueve el reclutamiento de monocitos circulantes hacia la CP, donde inician su proceso de diferenciación hacia macrófagos, en coincidencia con lo observado por Rufus Daw en su tesis de doctorado (291). Los datos también indicaron que la acumulación de macrófagos observada en la CP se debe en parte a proliferación, especialmente de LPM (Figura 4.6.9). El perfil de diferenciación de macrófagos observado recuerda al descrito por Finlay y colaboradores para los macrófagos de la cavidad pleural de ratones C57BL/6 infectados con *L. sigmodontis*. En ese sistema, señales provenientes de las células Th2 y transducidas por el receptor de IL-4 aceleran la progresión de monocitos hacia macrófagos residentes, atravesando el estadio intermedio de CCM (143), caracterizado por niveles intermedios marcadores de residencia tisular como GATA6 y F4/80, como parte del proceso de integración a la población de macrófagos residentes ($F4/80^{altos}$) (143).

En cuanto a los efectos del bloqueo de CD40L durante la infección, como se mencionó previamente, el análisis multidimensional realizado no mostró diferencias significativas en las poblaciones presentes en la CP, en condiciones basales o en infección. Sin embargo, a nivel de cuantificación convencional se observó una mayor acumulación de CPM y SPM en ratones infectados tratados con el anticuerpo MR1 en comparación con los tratados con anticuerpo control (Figura 4.6.5). El hecho que esta diferencia no se haya detectado en los UMAP probablemente se deba a que éstos son útiles para identificar diferencias marcadas y patrones generales, pero su nivel de resolución no les permite discriminar poblaciones con variaciones sutiles (292). Esta acumulación de CPM y SPM en animales infectados tratados con el anticuerpo MR1, junto con el efecto observado en ausencia de infección, donde en el *cluster* de LPM se identificó una subpoblación con menor grado de madurez según la expresión de CD102 (Figura 4.6.4), sugiere que el CD40L podría ser una señal capaz de acelerar la diferenciación de macrófagos a partir de monocitos. El hecho de que este efecto parezca manifestarse también en ausencia de infección sugiere la posibilidad de que incluso el CD40L disponible en condiciones basales pueda ser efectivo para esta posible función. De verificarse tal función de CD40L disponible en condiciones basales, la misma no necesariamente implica una señalización directa sobre monocitos, si bien ésta es una posibilidad. Existe alguna evidencia de efectos sobre monocitos del CD40L disponible en condiciones basales (221). Un posible efecto del CD40L en condiciones basales podría haber pasado desapercibido en las Secciones 1, 2 o 3 del capítulo de Resultados debido a la falta del análisis de los números de monocitos y de una discriminación más detallada de los subtipos de macrófagos no LPM presentes en la CP. De todos modos, los resultados obtenidos en esta tesis no son suficientes para concluir con ningún grado de certeza sobre la

participación del CD40L en la diferenciación de monocitos a macrófagos, ya que esto requeriría un análisis detallado de marcadores de trayectoria, en condiciones basales y de infección; además, para el contexto de infección se necesitarían evaluaciones a distintos tiempos.

En cuanto al efecto del bloqueo de CD40L sobre el fenotipo de los macrófagos de la CP en el contexto de infección, la presencia del anticuerpo MR1 potenció la expresión de Ym1 en LPM, CPM y SPM, así como la proliferación de los LPM (Figuras 4.6.8 y 4.6.9). Estos resultados, junto con la ausencia de efectos del CD40L constitutivo sobre las mismas respuestas inducidas por IL-4 exógena (Secciones 1 y 2 de Resultados), sugieren que el CD40L disponible en un contexto en el que hay interacciones específicas de antígeno limita las respuestas de los macrófagos a la IL-4/IL-13. Esta observación coincide, en términos generales, con los resultados obtenidos por I. González, quien en un sistema *in vitro* observó que el CD40L inducido por la interacción específica entre células T $CD4^+$ y macrófagos de la CP en condiciones basales, inhibe la expresión de RELM-α, de forma parcialmente dependiente de CD40.

El bloqueo de CD40L en el contexto de infección mostró efectos diferenciales sobre los distintos tipos de macrófagos de la CP y sobre las distintas respuestas de macrófagos analizadas. Así, la interpretación detallada de los resultados es compleja. Razonamos que deben estar en juego al menos tres factores intrínsecos de los macrófagos, cuyo efecto combinado daría lugar al patrón de resultados observado. En primer lugar, el nivel basal de expresión de CD40 en cada subtipo de macrófagos parece ser un determinante de su respuesta al CD40L. Como se mencionó en la sección 3.4.6 de Materiales y Métodos, los macrófagos definidos en los experimentos de infección como CPM y SPM incluyen mayoritariamente a IMacs (291). Según resultados obtenidos por I. González, los IMacs son menos sensibles que los LPM tanto a los agonistas de CD40 como al CD40L inducido por interacciones específicas con antígeno, lo cual parece correlacionar con su menor expresión de CD40 en comparación con los LPM (Figura 4.3.1). Además, los SPM en sentido estricto y las células intermedias entre estos y LPM, potencialmente presentes como fracción minoritaria dentro de nuestras definiciones de CPM y SPM, también deben expresar bajos niveles de CD40 (como se mostró para los SPM en sentido estricto en la Figura 4.1.1) y ser poco sensibles al CD40L. Segundo, la capacidad de presentación antigénica, dada en parte por el nivel de expresión de MHCII de cada tipo de macrófago, podría ser otro factor relevante que condicione la respuesta al CD40L en un contexto de reconocimiento antigénico específico. Este razonamiento parte de la base de que el CD40L presente en el contexto de una sinapsis inmunológica debe ser más efectivo que el CD40L detectado por el macrófago fuera de tal contexto. Si bien la infección por *H. polygyrus* indujo un

aumento significativo en la expresión de MHCII en la superficie únicamente de los LPM, los CPM y SPM presentan niveles basales de MHCII incluso superiores a los alcanzados por los LPM durante la infección (Figura 4.6.7). Además, la acumulación de IMacs en la CP de ratones infectados podría inhibir por competencia el establecimiento de interacciones específicas entre células T $CD4^+$ y LPM. Tercero, una parte del impacto del CD40L en el contexto de infección podría ser consecuencia de efectos indirectos sobre los macrófagos. Tales efectos indirectos podrían ser importantes, dado el bajo número de células T $CD4^+$ que parece estar recibiendo estimulación antigénica en la CP de ratones infectados. Como ya se discutió, esto sugiere que solo una minoría de los macrófagos del sitio serían directamente estimulados por CD40L inducido/disponible en contexto de interacciones específicas de antígeno. El principal candidato a medir efectos indirectos sobre los macrófagos que inhiban las respuestas a la IL-4 es el IFN-γ, cuya producción podría ser potenciada por la estimulación de CD40 y la producción de IL-12. Resultados obtenidos por Rufus Daw (291) mostraron que durante la infección por *H. polygyrus* se desencadena una respuesta mixta Th1/Th2 en la CP, dado el aumento observado en la frecuencia de células Th2 $CD4^+$ $GATA3^+$ y la presencia sostenida de un subconjunto de células Th1 $CD4^+$ $Tbet^+$ en este entorno. Además, en dicho trabajo se demostró que, frente a la re-estimulación *in vitro* de células de la CP, las células NK producen IFN-γ (a diferencia de la mayoría de las células T $CD4^+$ y $CD8^+$, que responden a la infección con IL-13). Considerando que el IFN-γ es capaz de inhibir tanto la proliferación como la expresión de marcadores M(IL-4) en los macrófagos (289,293,294), cabe la posibilidad de que el IFN-γ contribuya a dicha inhibición, en forma relacionada a lo discutido en la sección 5.1.2 y como se ilustra en la Figura 5.1. En relación con esto, se ha reportado que los LPM expresan niveles más altos de ARNm del receptor de IFN-γ (IFNgR1) que los SPM en sentido estricto y que los IMacs, lo que podría explicar su mayor capacidad de respuesta a esta citoquina (295). En un modelo *in vivo*, se ha observado que la administración de IFN-γ recombinante induce la pérdida de LPM por apoptosis, mientras que promueve el reclutamiento de IMacs, siendo ambos efectos consecuencia de una señalización directa sobre estas células (296). Esto apoya la idea adicional de que el IFN-γ puede ejercer efectos diferenciados sobre los distintos tipos de macrófagos.

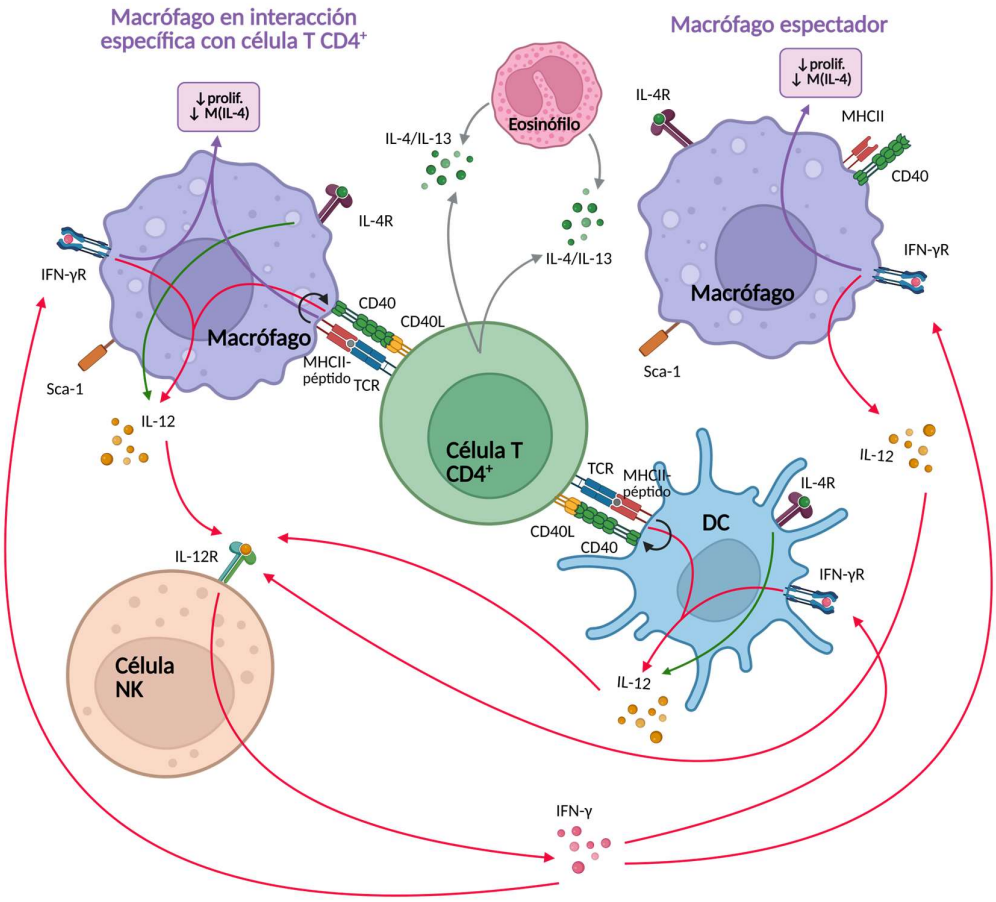


Figura 5.1. Modelo de posibles mecanismos que explican la inhibición de la proliferación y polarización M(IL-4) de los macrófagos de la CP durante la infección por *H. polygyrus*. El CD40L expresado por células T CD4$^+$, tras el reconocimiento de péptidos de *H. polygyrus* presentados en MHCII podría actuar directamente sobre el macrófago a través de CD40, inhibiendo su proliferación y su polarización M(IL-4) en respuesta a la IL-4 producida en parte por las células T CD4$^+$ y eosinófilos durante la infección (49). Además, según lo observado por Rufus Daw (291), en la CP de ratones infectados por *H. polygyrus*, las células NK producen IFN-γ, mientras que no se observa una respuesta similar de parte de células T. A nivel especulativo, esta producción de IFN-γ podría ser en respuesta a la IL-12 generada por la interacción específica entre macrófagos y/o DC con células T CD4$^+$; esta producción además podría ser potenciada por el efecto "paradojal" de la IL-4 en macrófagos o DC estimulados por agonistas de CD40 (280–286). El IFN-γ a su vez actuaría sobre macrófagos y DC promoviendo aún más la expresión de IL-12, en un bucle de retroalimentación positiva, además de la expresión de Sca-1, marcador de la exposición de células mieloides a IFN-γ, detectado en el trabajo mencionado. Este IFN-γ podría actuar tanto sobre macrófagos en interacción específica con células T CD4$^+$ como sobre macrófagos espectadores, inhibiendo sus respuestas a la IL-4/IL-13. Por simplicidad, en el esquema se representa un macrófago genérico, que podría corresponder a LPM, CPM o SPM presentes en condiciones basales o a IMacs (si bien en los datos de esta sección, los IMacs no fueron discriminados de los CPM o SPM). Las flechas rojas indican el eje IL-

12/IFN-γ, y las violetas, los efectos sobre las respuestas de macrófagos que se midieron en el trabajo. Figura generada en Biorender.

En este trabajo, no se observó que el bloqueo de CD40L afectara la expresión de RELM-α durante la infección en ninguno de los tipos de macrófagos analizados (Figura 4.6.8). En el caso de los LPM, se detectó una respuesta a la infección baja en términos de expresión de RELM-α. Esto concuerda con resultados obtenidos por Rufus Daw en la misma cepa de ratones (291). Asimismo, experimentos nuestros en los que se infectaron ratones C57BL/6 y BALB/c en paralelo sugieren que la primera cepa monta, frente a la infección por *H. polygyrus*, una respuesta de RELM-α en LPM pobre en comparación con la segunda (datos no mostrados). Así, el hecho que los LPM de ratones C57BL/6 monten una repuesta de RELM-α muy débil en infección por *H. polygyrus* podría haber dificultado la detección de un posible efecto inhibitorio, en contraste con lo observado para la expresión de Ym1 y la proliferación. Por otro lado, la observación de que la clara expresión de RELM-α mostrada por SPM y CPM no fue modificada por el bloqueo de CD40L coincide con los resultados de I. González, quien observó que los IMacs son menos sensibles tanto a agonistas de CD40 como al CD40L inducido por interacciones específicas con antígeno. Esto a su vez probablemente se explique, como se mencionó anteriormente, por la baja expresión de CD40 que presentan estos tipos celulares.

En contraste con lo observado para RELM-α, el bloqueo de CD40L potenció la expresión de Ym1 en todos los tipos de macrófagos analizados de la CP de ratones infectados con *H. polygyrus* (Figura 4.6.8). En el sistema *in vitro* desarrollado por I. González, se observó que la expresión de Ym1 inducida por IL-4 fue inhibida por la presentación antigénica de manera totalmente independiente de CD40, sin determinarse si esta inhibición dependió de CD40L (actuando a través de receptores alternativos) o de otras moléculas expresadas por las células T $CD4^+$. Además, I. González observó que este efecto inhibitorio fue más evidente en los macrófagos obtenidos de la CP basal que en los IMacs. Una explicación que conciliaría los resultados *in vitro* de I. González con los obtenidos en el modelo de infección es esta tesis es que CD40L inhiba la expresión de Ym1 inducida por IL-4 a través de receptores alternativos a CD40. Otra posibilidad es que la expresión de Ym1 en el contexto de infección por *H. polygyrus* esté regulada por señales distintas a la IL-4, no evaluadas en el modelo reduccionista *in vitro*, que sí puedan ser moduladas negativamente por la interacción entre CD40L inducido por antígeno y CD40. Tales señales en principio podrían incluir a la IL-13, si bien razonamos que los efectos de CD40L sobre las respuestas a la IL-4 y a la IL-13 deberían ser similares, dada la similitud de receptores, que comparten una de las subunidades

(13). Además, como se discutió previamente, no puede descartarse que el efecto inhibitorio observado se deba a mecanismos indirectos, mediados por la acción del IFN-γ, cuya intensidad sea diferente en los sistemas experimentales comparados.

Finalmente, los resultados de los experimentos empleando el bloqueo de CD40L sugieren que el CD40L inducido por antígeno se opone a la proliferación de los LPM en respuesta a la IL-4 (y/o IL-13) (Figura 4.6.9). Este hallazgo resulta novedoso, a falta de resultados en términos de proliferación en los sistemas *in vitro*. No obstante, el resultado es coherente con lo observado para los marcadores de polarización M(IL-4), lo que refuerza la idea de un efecto global del CD40L en este contexto que se opone a las señales inducidas por IL-4/IL-13. La falta de impacto del CD40L sobre la proliferación de los CPM y SPM podría explicarse por la baja respuesta proliferativa que estas células mostraron a la infección, como se observa en los resultados de incorporación de EdU (Figura 4.6.9). También podría explicarse por una menor sensibilidad de estas células, en comparación con los LPM, a agonistas de CD40 y/o a IFN-γ (295), factores ambos ya mencionados.

Desde una perspectiva más global sobre el papel del CD40L en la respuesta sistémica contra el parásito, el bloqueo de CD40L no generó cambios en las citoquinas Th2 producidas por células de los ganglios drenantes del sitio de infección luego de re-estimulación *ex vivo* (datos no mostrados). Esto probablemente se deba a que el bloqueo de CD40L se realizó con posterioridad al comienzo la infección, y por lo tanto se dio tiempo a la inducción de la respuesta adaptativa. Sin embargo, se observó un aumento en la carga parasitaria en los ratones tratados con el anticuerpo bloqueante de CD40L en comparación con los tratados con anticuerpo control (Figura 4.6.2). Este resultado parece contrastar con los datos obtenidos para la CP, donde el bloqueo de CD40L potenció las respuestas de tipo 2 de los macrófagos, considerando que la polarización M(IL-4) ha sido reportada como importante para la eliminación de este parásito (297). Una posible explicación es que la señalización a través de CD40L podría desempeñar funciones diferentes dependiendo del microambiente tisular. El papel de la polarización M(IL-4), y en particular la expresión de Arginasa-1, para la eliminación del gusano (297) se ha asociado con macrófagos del sitio en el que se aloja el parásito, es decir el intestino. La respuesta al bloqueo de CD40L por parte de los macrófagos intestinales no fue estudiada en esta tesis, y podría diferir de la observada en los macrófagos peritoneales. En el intestino, las respuestas de los macrófagos no dependen únicamente de la presencia de IL-4/IL-13, sino también de la liberación de alarminas, como la IL-33 (298), que inducen polarización M(IL-4) tanto de forma dependiente como independiente de la potenciación de la producción de IL-4 (299). No se conocen los efectos de CD40L sobre macrófagos estimulados por IL-33 además de IL-4/IL-13, y por lo tanto es posible que en tal contexto el bloqueo de

CD40L tenga un efecto negativo sobre los mecanismos efectores de macrófagos involucrados en la eliminación del gusano. Además, el bloqueo de CD40L no afecta únicamente a los macrófagos, sino que también podría tener implicancias sobre otros potenciales mecanismos efectores, en particular aquellos mediados por células B y anticuerpos, dada la importancia de CD40L para la proliferación de estas células y el cambio de clase de anticuerpos en la reacción de centro germinal. Más especulativamente, existe la posibilidad de que el CD40L sea importante en el intestino para que las células B proliferen y produzcan IgE localmente en respuesta a la IL-4 y CD40L como mecanismo antihelmíntico (224). De este modo, se podría postular que, en la CP, el CD40L limitaría la polarización M(IL-4) de los macrófagos previniendo una respuesta profibrótica excesiva en un sitio donde el parásito no reside, mientras que, en el intestino, CD40L colaboraría a mecanismos de defensa más amplios orientados a la eliminación efectiva del parásito.

De manera complementaria, se estudió cómo CD40L afecta las respuestas de las KC en el contexto de la infección por *H. polygyrus*. Estudios previos han reportado la presencia de células T $CD4^+$ productoras de IL-4 en el hígado en contexto de infección por *H. polygyrus* (49). Considerando que la conexión anatómica con el intestino permite el arribo de antígenos intestinales al hígado (300), resulta razonable suponer que allí puede ocurrir presentación antigénica en la infección por este gusano. En concordancia, una fracción considerable de las células T $CD4^+$ presentes en el hígado de animales con dos semanas de infección expresan CD69 (49). Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la expresión de CD40L en la superficie de las células T $CD4^+$ presentes en el hígado entre animales infectados y controles (Figura 4.6.12). La ausencia de un aumento detectable en esta expresión podría estar vinculada a la naturaleza transitoria del CD40L de superficie (210) y a las limitaciones técnicas para su detección en momentos específicos con una cinética distinta a la de la CP. En forma alternativa o complementaria, el entorno particular del hígado, caracterizado por mecanismos que favorecen la inducción de tolerancia inmunológica y restringen respuestas efectoras frente a antígenos derivados del tracto digestivo (301), podría contribuir a limitar la activación completa de las células T $CD4^+$. Las KC suelen presentar niveles reducidos de CD40, MHCII, CD80 y CD86 en comparación con otras APC, como las DC esplénicas (302). En la misma dirección, se ha reportado que las KC no son potentes activadoras de células T específicas (302). Esto podría explicar que el CD40L presente en el contexto de infección por *H. polygyrus* en el hígado sea comparable con el CD40L presente en el mismo sitio en ausencia de infección, cuyo efecto sobre la proliferación de las KC en respuesta a la administración de IL-4 exógena fue nulo (Figura 4.2.11). En la misma línea, si bien la infección por sí sola promovió el reclutamiento de células circulantes al hígado, incluyendo monocitos, eosinófilos, células T $CD4^+$ y células B, así como la proliferación de las KC, el

bloqueo de CD40L no tuvo efecto sobre ninguna de estas respuestas (Figuras 4.6.11 y 4.6.13).

5.1.4 Integración: Efecto de los distintos agonistas de CD40 sobre las respuestas de los macrófagos en un contexto de tipo 2

Parte de las preguntas que guiaron esta tesis se basan en que distintos formatos de CD40L y otros agonistas de CD40 pueden tener efectos diferentes sobre las células que expresan CD40 (220,262,303). En condiciones basales, es decir, en ausencia de una intervención destinada a generar interacciones específicas de antígeno, el CD40L endógeno no mostró un efecto detectable sobre la proliferación ni sobre la polarización de los macrófagos peritoneales ni de las KC en respuesta a la IL-4. Además, este CD40L tampoco influyó sobre la expresión de marcadores que no dependen necesariamente de la señalización de IL-4, como MHCII. Por lo tanto, aunque las células T $CD4^+$, particularmente aquellas con fenotipo V, expresan constitutivamente CD40L de superficie, los macrófagos no serían blanco de este CD40L, a pesar de interaccionar con él a través de CD40, como surge de los ensayos sobre regulación de CD40L de superficie por macrófagos.

Por otro lado, al utilizar agonistas solubles exógenos de CD40, tanto *in vitro* como *in vivo*, se observó un efecto claramente inhibitorio sobre las respuestas de los macrófagos inducidas por IL-4, consistentes con estudios previos que describen funciones antagónicas entre la vía CD40 y la señalización de tipo 2 en macrófagos en otros sistemas experimentales (262). Estos datos indican que la activación de la vía CD40-CD40L, incluso en ausencia de una interacción célula-célula, puede interferir con las señales de tipo 2 en macrófagos, probablemente a través de mecanismos intracelulares activados por CD40 que contrarrestan los efectos de IL-4. Además, en sistemas donde hay más de un tipo celular, es probable que existan efectos indirectos del CD40 en la misma dirección, por ejemplo, a través de IFN-γ.

Finalmente, en el modelo de infección por *H. polygyrus*, en el cual los resultados sugieren fuertemente la presencia de interacciones específicas entre las células T $CD4^+$ y APC de la CP, el bloqueo de CD40L condujo a un aumento de la proliferación y polarización M(IL-4) de los macrófagos peritoneales. Este efecto sugiere que el CD40L, en un contexto de interacción inmunológica específica de antígeno, limita la activación de los macrófagos inducida por IL-4, en concordancia con lo observado al utilizar agonistas exógenos. En este escenario, el ligando podría actuar como un modulador negativo de la respuesta de tipo 2 en los macrófagos,

posiblemente evitando una activación excesiva profibrótica y contribuyendo al mantenimiento del equilibrio inmunológico.

En conjunto, estos resultados indican que el impacto del CD40L sobre los macrófagos no depende exclusivamente de la presencia de esta molécula, sino también del contexto en el cual se expresa. Durante la presentación de antígeno, la formación de una sinapsis inmunológica madura conduce a la concentración polarizada de CD40L en la superficie de la célula T $CD4^+$, lo que facilita su interacción con la APC. Esta localización dirigida de CD40L depende estrictamente del reconocimiento antigénico por el TCR, así como de la presencia de moléculas de adhesión celular y de un citoesqueleto funcional (304). De este modo, se postula que la sinapsis inmunológica cumple un rol crítico en la regulación del ensamblaje de complejos de señalización (304). Por otro lado, se ha demostrado que los anticuerpos agonistas de CD40, además de la interacción específica a través del paratope, se entrecruzan entre sí mediante su región Fc al unirse a receptores Fc presentes en otras APC, lo cual resulta esencial para su actividad inmunoestimuladora *in vivo* (305,306). Este entrecruzamiento de los anticuerpos podría inducir de alguna manera una organización polarizada de CD40L en la membrana plasmática de la célula T $CD4^+$, similar a lo que ocurre durante la formación de la sinapsis inmunológica. Por lo tanto, no es inesperado que los efectos del CD40L inducido por la presentación antigénica y el observado por el anticuerpo agonista de CD40 sobre los macrófagos sean similares. En contraste, la interacción de macrófagos con el CD40L expresado constitutivamente en principio ocurre en ausencia de moléculas accesorias que promuevan el agrupamiento de CD40L en la interfase con el macrófago, agrupamiento que podría ser necesario para una señalización efectiva a través de CD40. Este razonamiento se apoya también en que la falta de efecto sobre los macrófagos no parecería explicarse por la baja disponibilidad del CD40L endógeno basal (Figura 4.1.7). La Figura 5.2 busca integrar los resultados obtenidos, en relación a cómo los distintos agonistas de CD40 afectan o no las respuestas de los macrófagos a la IL-4, así como la regulación por parte de los macrófagos de CD40L de superficie en células T $CD4^+$.

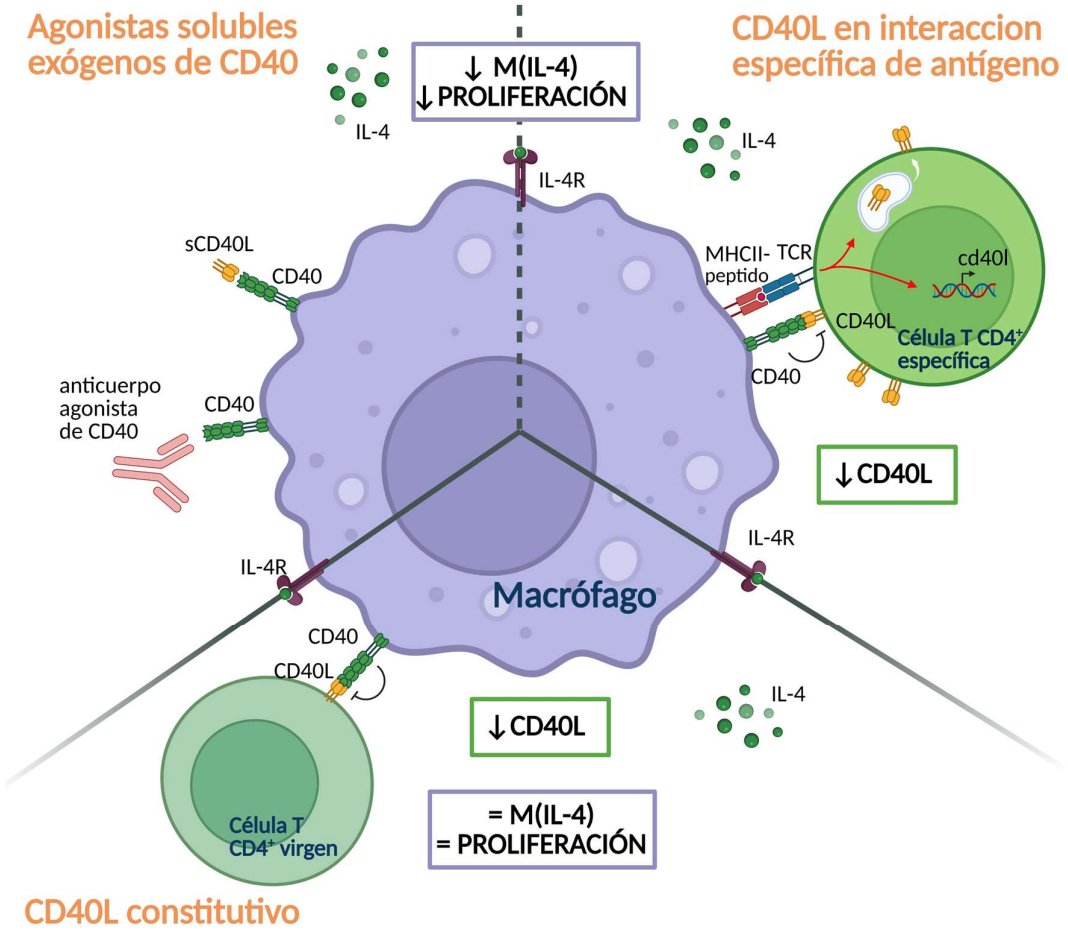


Figura 5.2. Resumen del impacto de los distintos agonistas de CD40 en las respuestas de los macrófagos a la IL-4. Los agonistas solubles exógenos de CD40, así como el CD40L inducido por antígeno, atenúan las respuestas de los macrófagos a la IL-4. Por el contrario, el CD40L endógeno en un contexto basal, que incluye el CD40L constitutivo expresado en la superficie de las células T $CD4^+$ V, no afecta estas respuestas, a pesar de interactuar con los macrófagos a través de CD40. Tanto el CD40L inducido por antígeno como el constitutivo están regulados por la presencia de CD40. Ilustración generada en Biorender.

5.2 El CD40L constitutivo y su posible vínculo con el mantenimiento de los números homeostáticos de células inmunes en la CP

Durante el estudio orientado a evaluar el impacto del CD40L presente en condiciones basales en la CP sobre las respuestas de los macrófagos a la IL-4, se obtuvo, de manera inesperada, evidencia que sugiere que el CD40L constitutivo podría ser necesario para la localización de células T $CD4^+$ V en dicha cavidad. Los ratones CD40 KO presentaron una disminución de aproximadamente el 95% en los números de células T $CD4^+$ V en la CP en comparación con ratones WT (Figura 4.4.2). Además, el bloqueo de CD40L en ratones WT generó una reducción del 50% aproximadamente en estas células en la CP respecto a los tratados con el anticuerpo control (Figura 4.4.5). En cambio, los números de células T $CD4^+$ V en bazo y ganglios mesentéricos fueron normales en ratones CD40 KO (Figura 4.4.3), lo que sugiere que esta alteración no refleja una pérdida global de las células T $CD4^+$ V, sino una falla en su localización en la CP, y potencialmente en otros sitios no linfoides. Por otro lado, la ausencia de CD40 también se asoció a déficits en las células T $CD4^+$ MC y ME y en células T $CD8^+$ V y $CD8^+$ ME en la CP, aunque de menores grados que el observado para las células T $CD4^+$ V. (Figura 4.4.2). El bloqueo de CD40L, además de causar disminución en los números de células T, causó reducciones (no observadas en ratones CD40 KO) en los números de todos los tipos celulares de la cavidad que fueron analizados, con la clara excepción de los LPM (Figura 4.4.5). Esta diferencia entre el fenotipo de los ratones CD40 KO y los ratones WT tratados con anticuerpo bloqueante de CD40L podría explicarse por la existencia de receptores alternativos para CD40L; así, las disminuciones observadas en poblaciones no T luego del bloqueo de CD40L podrían no deberse a señalización mediada por CD40. En suma, estos datos preliminares sugieren que la interacción CD40L-CD40 podría ser necesaria para la localización a la CP de las células que más expresan CD40L constitutivamente (células T $CD4^+$ V) y, de forma menos marcada, de células T $CD8^+$ V, que no expresan CD40L; además, la interacción podría contribuir más débilmente a localización en la CP de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ no V.

Tradicionalmente se ha considerado que las células T V recirculan exclusivamente entre los órganos linfoides secundarios, utilizando la linfa y el torrente sanguíneo como principales rutas de tránsito. Su ingreso a estos órganos ocurre a través de vénulas de alto endotelio (HEV, de sus siglas en inglés *high endothelial venules*), donde el proceso de extravasación se inicia de manera dependiente de CD62L, una molécula de adhesión característicamente expresada en células T V (307,308). No obstante, diversos estudios han demostrado de forma contundente la presencia de

células T V en sitios anatómicos extra-linfoides. En órganos sólidos no linfoides como pulmón, hígado, cerebro, intestino, testículos, páncreas y riñones se detectan cantidades variables pero claramente cuantificables de células T $CD4^+$ V y T $CD8^+$ V, identificables tanto desde el punto de vista fenotípico como funcional, ya que estas células no expresan citoquinas efectoras en respuesta a estimulación policlonal (309–314). Las células T V migran activamente entre los sitios extra-linfoides y la circulación linfática, como lo evidencia su desaparición tras el tratamiento con fármacos que bloquean la salida de linfocitos desde los ganglios linfáticos (309–311). La presencia de células T V en tejidos no linfoides desafía los dogmas tradicionales de distribución linfocitaria, lo que ha llevado a algunos autores, como Westermann y colaboradores (313), a proponer que es necesario un cambio de paradigma. Según estos autores, la mayor representación de células T V en órganos linfoides, en comparación con los sitios no linfoides, no se debería necesariamente a una mayor tasa de ingreso, sino a diferencias en los tiempos de permanencia. En particular, el tránsito más prolongado en órganos linfoides reflejaría una mayor frecuencia de interacciones con APC, en contraste con lo que ocurre en tejidos no linfoides. Más allá de estas opiniones, en principio nuestras observaciones que sugieren que la ausencia de CD40 o el bloqueo de CD40L afectan la localización de células T V en la CP podrían interpretarse a base a que la interacción CD40-CD40L sea necesaria para el ingreso o para su retención en el sitio de dichas células.

La entrada y salida de leucocitos en la CP parecería concentrarse en los FALC, estructuras inmunológicas asociadas al mesotelio y predominantemente localizadas en el omento (98,105,111,315–317). Se entiende que para circular de la sangre a la CP, los leucocitos atraviesan primero las HEV presentes en el endotelio de los FALC y luego cruzan el mesotelio a través de pequeñas aberturas llamadas estomas, situadas entre células especializadas conocidas como células de cubierta (105,317). Se ha reportado que las células del mesotelio expresan CD40, con consecuencias funcionales en contextos de inflamación (318,319). Así, un tipo de explicación para las observaciones realizadas en nuestro trabajo sería que la señalización a través de CD40 facilitara el pasaje de células T $CD4^+$ V a través de los estomas y, a su vez indujera señales en las células de cubierta que habilitaran la entrada a la CP de otras poblaciones, incluyendo las células T CD8+ V. Estas posibilidades se ilustran en el modelo de la Figura 5.3.

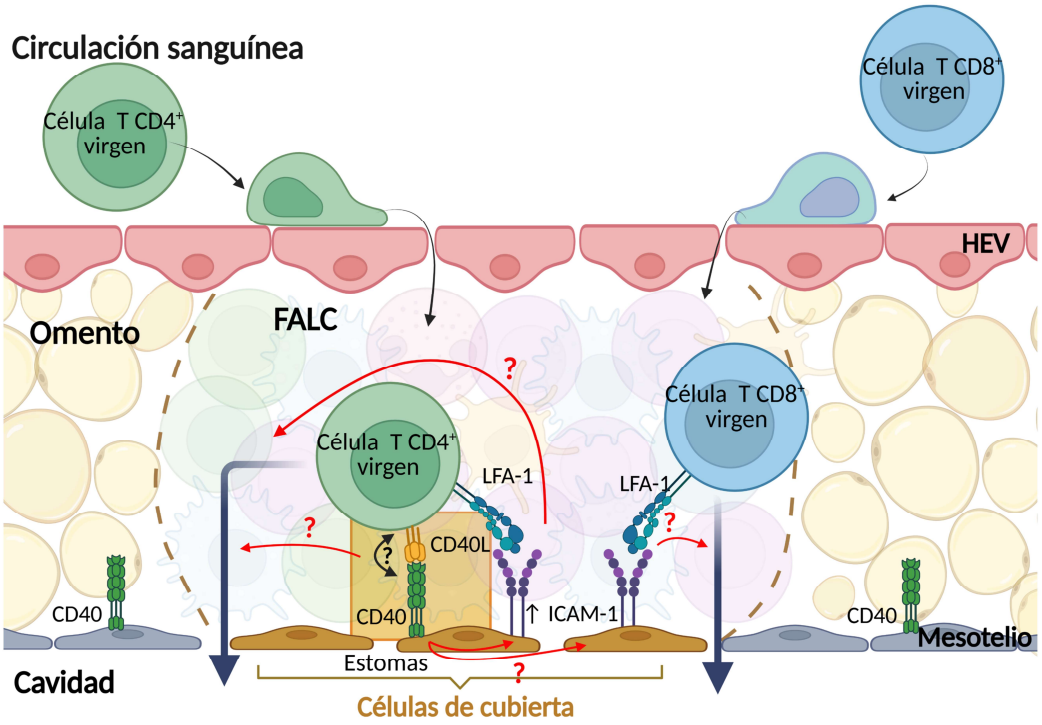


Figura 5.3. Modelo de posible participación de la interacción CD40L-CD40 en el ingreso de células T V a la CP. En los FALC, una vez que las células T CD4⁺ V extravasan a través de las vénulas del endotelio alto (HEV), la interacción del CD40L constitutivo con el CD40 de las células de cubierta potenciaría la expresión de moléculas de adhesión celular, favoreciendo así el ingreso de células T CD4⁺ V y CD8⁺ V a la CP. Este modelo es también válido para el ingreso de células T CD4⁺ y CD8⁺ no V mediante su interacción con moléculas de adhesión celular expresadas en el mesotelio. Ilustración generada en Biorender.

La otra posibilidad para explicar nuestros resultados es que las células T CD4⁺ V requieran la interacción con CD40 expresado por APC dentro de la CP para tener un tiempo de permanencia significativo en este sitio, en consonancia con lo que proponen Westermann y colaboradores (313). Los resultados presentados en esta tesis descartan que los macrófagos sean importantes para dicho tiempo de permanencia, ya que al transferir macrófagos WT a la CP de ratones CD40 KO no se observó una mayor recuperación de células T CD4⁺ V en comparación con la transferencia de macrófagos CD40 KO (Figura 4.2.5). También resulta poco probable que las células B desempeñen un papel relevante en un posible mecanismo de retención de las células T CD4⁺ V en la CP, considerando que estas células expresan bajos niveles de CD40 homeostáticamente (Figura 4.1.1), y que el efecto reportado del CD40L sobre las células B autorreactivas no es directo sobre ellas (220). En cambio, las DC parecen buenas candidatas a determinar la permanencia de las células T CD4⁺ V en la CP a través de la interacción de CD40-CD40L, como se desarrolla en los párrafos siguientes.

En lo que respecta al tiempo de tránsito de las células T $CD4^+$ V en los órganos linfoides, se ha demostrado que éste depende de interacciones con MHCII expresado en DC (264,265). Además, la interacción del TCR con complejos MHCII-péptido propio, probablemente presentados también por DC, interacción que genera señales similares a las inducidas por péptidos foráneos pero por debajo del umbral de activación de la célula T $CD4^+$, es importante para promover la supervivencia y ajustar el umbral de activación de las células T V (265,320,321). En base a esto, es concebible que, en la CP, se produzcan interacciones por debajo del umbral de activación, en las que las DC presenten péptidos propios mediante MHCII al receptor T de células T $CD4^+$ V. Este tipo de interacciones podría requerir la participación de la vía CD40–CD40L para regular la permanencia de estas células en la CP.

La posibilidad de una interacción entre células T $CD4^+$ V y DC en la CP puede encajar con la observación de que la interacción CD40-CD40L parece estar involucrada también en la localización de células T $CD8^+$ V en este compartimento. En general, el inicio de las respuestas de células T $CD8^+$ contra antígenos exógenos requiere una interacción tripartita entre DC, células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$, donde el CD40L expresado por las células T $CD4^+$ activa a las DC, permitiéndoles a su vez activar a las células T $CD8^+$ mediante moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 (322,323). Siguiendo esta línea, sería posible que una interacción similar ocurra en la CP, con la función potencial de proporcionar señales de supervivencia a las células T $CD8^+$ V. En consonancia con esta hipótesis, se ha reportado que los órganos linfoides secundarios son dispensables para la generación de las señales para supervivencia para las células T $CD8^+$ V (324). La Figura 5.4 ilustra un posible modelo en el que se propone que la señalización mediada por CD40-CD40L sería necesaria para la retención temporal de las células T V, $CD4^+$ y $CD8^+$, en la CP, a través del contacto con una APC, siendo las DC las principales candidatas para mediar este efecto. En este escenario, sería esperable que las DC respondan al CD40L constitutivo con aumentos en la expresión de moléculas necesarias para la interacción específica con células T, como MHCI, MHCII, CD80, CD86, e ICAM-1, diferencia de lo observado en los LPM y SPM, en los que la expresión de MHCII no se vio afectada por el bloqueo de CD40L o la ausencia de CD40 (Figuras 4.2.10 y 4.2.14).

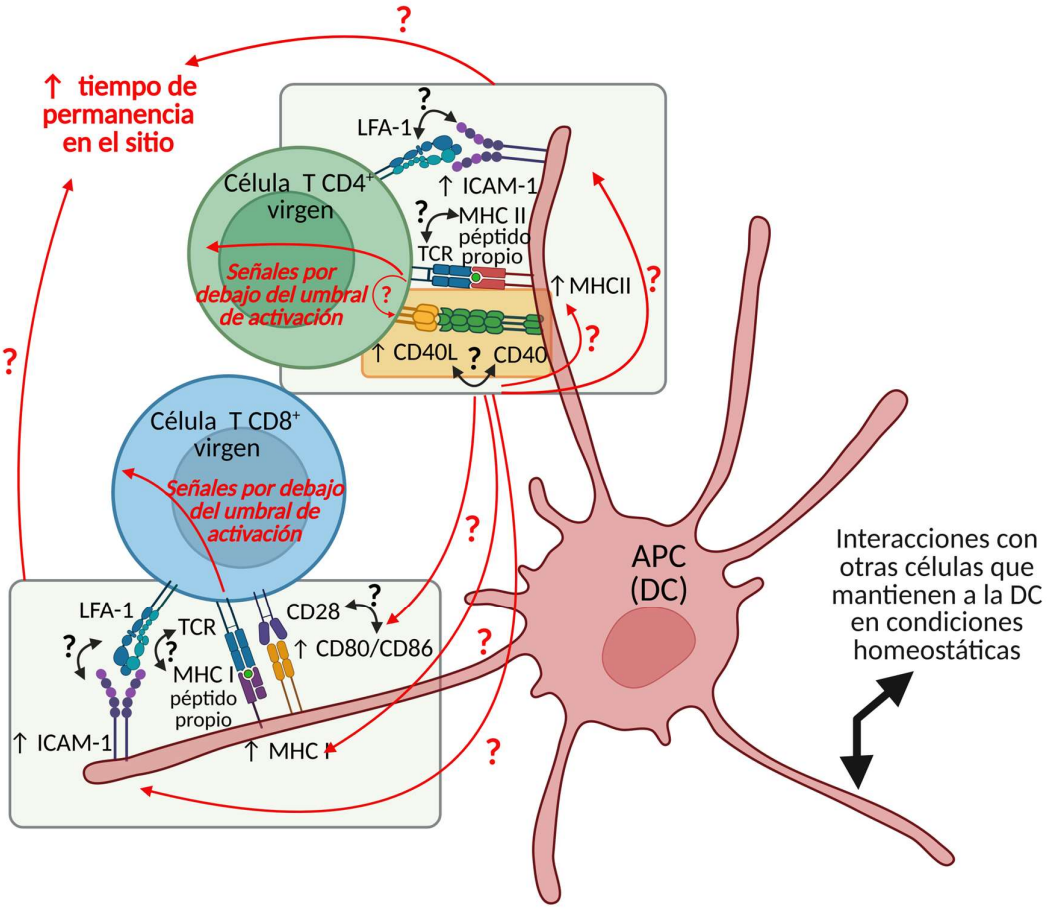


Figura 5.4. Modelo de retención temporal de las células T V a la CP. La interacción del CD40L constitutivo de las células T CD4⁺ V con el CD40 de APC (probablemente DC) en un contexto de presentación antigénica sub-umbral de activación contribuiría a la retención de estas células en la CP, apoyada por moléculas de coestimulación y/o adhesión. A su vez, la activación de CD40 en la APC potenciaría la expresión de MHCI, CD80/CD86 y/o moléculas de adhesión como ICAM-1 y LFA-1 que permitirían, indirectamente, la retención de células T CD8⁺ V en la CP. Este modelo también podría explicar la retención de células T CD4⁺ y CD8⁺ no V mediante su interacción con las APC, a través de moléculas de adhesión celular. Ilustración generada en Biorender.

En resumen, los hallazgos presentados en la Sección 4 del capítulo de Resultados de esta tesis abren nuevas perspectivas para comprender la función de la expresión constitutiva de CD40L por parte de las células T CD4⁺ V, y fortalecen la evidencia sobre la presencia de células T V en tejidos no linfoides, un fenómeno cuya función aún permanece sin esclarecer.

5.3 Búsqueda de señales coestimuladoras necesarias para la proliferación *in vitro* de macrófagos inducida por IL-4.

La proliferación supra-homeostática de macrófagos fue reportada por primera vez hace casi quince años, particularmente en modelos de infección por helmintos, donde la IL-4 e IL-13 actúan como las principales citoquinas inductoras (61,76). Investigaciones posteriores demostraron que la administración exógena de IL-4 puede inducir la proliferación de macrófagos en todos los órganos y compartimentos anatómicos evaluados hasta el momento (61,76–79). Si bien en ciertos contextos, la disponibilidad exacerbada de M-CSF puede generar proliferación de macrófagos supra-homeostática, una vez que se establece un proceso inflamatorio Th2, la IL-4 (y/o IL-13) mantienen la proliferación, en forma independiente de M-CSF y por señalización directa sobre los macrófagos (58,61).

El M-CSF, así como el GM-CSF, inducen proliferación robusta de macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro* (325). En contraste, la IL-4 promueve la proliferación de macrófagos únicamente en condiciones *in vivo*, a excepción de cierto nivel de proliferación *in vitro* mostrado por los macrófagos alveolares (76,77). Dado que la IL-4 induce eficazmente la polarización M(IL-4) de macrófagos tanto *in vivo* como en cultivo ((67,77,82,94); Figuras 4.1.3, 4.1.4 y 4.1.7 de esta tesis), se descarta que una posible desdiferenciación de estas células en condiciones *in vitro* (127,143) afecte la señalización a través del receptor de esta citoquina. Esto sugiere, por tanto, la participación de una o más señales adicionales, ausentes o limitantes en cultivo, cuya identidad aún se desconoce y que serían necesarias para que la IL-4 desencadene una respuesta proliferativa en los macrófagos.

Si bien Minutti y colaboradores reportaron que C1q puede actuar como coestímulo para potenciar la proliferación de macrófagos peritoneales en respuesta a IL-4 en cultivo (77), los niveles de proliferación alcanzados fueron modestos y se observaron únicamente bajo condiciones experimentales que requerían concentraciones supra-fisiológicas de ambos estímulos. En el contexto de mi tesis realizamos ensayos similares, utilizando concentraciones de IL-4 y C1q más bajas que las empleadas por Minutti, aunque aún elevadas en comparación con otros experimentos *in vitro* realizados, sin observar un efecto proliferativo en los macrófagos (resultados no mostrados).

A raíz de las incertidumbres expuestas, se planteó la posibilidad de que el estímulo limitante para la proliferación *in vitro* de macrófagos peritoneales inducida por la IL-4 sea algún factor soluble presente en la CP, ya sea de forma constitutiva o

producido *in vivo* tras la administración de IL-4, que se perdería durante la preparación de las células para cultivo debido a los sucesivos lavados. En la exploración en torno a este punto, además de los macrófagos "basales" de CP, incluimos a los IMacs, considerando que éstos presentan una mayor capacidad proliferativa en respuesta a la IL-4 que los macrófagos residentes (135,146). Sin embargo, los resultados obtenidos fueron negativos en relación con la identificación de ese posible estímulo soluble, incluso en condiciones de enriquecimiento de los componentes macromoleculares presentes en los fluidos peritoneales ensayados (Figuras 4.7.1 y 4.7.2). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el factor limitante para la proliferación *in vitro* de macrófagos en respuesta a la IL-4 probablemente no sea un factor soluble presente en la CP. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que dicho estímulo sea un componente inestable, cuya actividad se pierde durante la preparación y manipulación de las muestras.

Se consideró también la posibilidad que la falta de proliferación de los macrófagos en cultivo se deba a las diferencias en la concentración de oxígeno entre los incubadores de cultivo convencionales y las condiciones fisiológicas presentes en la CP. Los incubadores de cultivos celular suelen mantener una atmósfera con aproximadamente 18.6 % v/v de oxígeno, que es ligeramente inferior al 20.9 % del aire ambiente, debido a la mezcla con CO_2. Esta concentración de oxígeno es de todos modos superior a la que experimentan la mayoría de las células en los tejidos vivos de los animales (266). En los tejidos del cuerpo humano, los niveles de oxígeno varían según el tipo de tejido y su microambiente. Por ejemplo, en los pulmones, la concentración de O_2 es de aproximadamente 13.7% v/v, mientras que en tejidos como la piel, o en tumores, los niveles pueden ser significativamente más bajos, cercanos al 1% de O_2 (326). La exposición a concentraciones de oxígeno más altas que las fisiológicas *in vivo* puede influir en la proliferación y metabolismo celular que ocurren en cultivos celulares. Un estudio reciente examinó cómo las condiciones basales de oxígeno afectan la respuesta de células de cáncer de próstata, observándose que tanto las tasas de proliferación como las de migración fueron mayores en las células cultivadas en 5 % v/v de O_2 frente a las cultivadas en 18 % v/v de O_2 (327). Sobre esa base, como se mostró en la Sección 7 del capítulo de Resultados, se evaluó si, bajo condiciones de concentración de O_2 menor a la de las condiciones de cultivo usuales (1 y 7 % v/v), la IL-4 podía inducir la proliferación de macrófagos. Los resultados mostrados fueron negativos en cuanto a la proliferación, y además se observó que la "hipoxia" afecta negativamente no solo la proliferación inducida por M-CSF, sino también la expresión de marcadores M(IL-4) inducidos por la estimulación con IL-4, tanto para los macrófagos de CP basal como para IMacs.

En suma, los intentos destinados a montar un sistema *in vitro* en el cual los macrófagos proliferen frente a la estimulación con IL-4 no resultaron satisfactorios. Por lo tanto, quedan pocas alternativas disponibles, considerando que se han evaluado tanto posibles estímulos solubles como cambios en las condiciones fisicoquímicas del cultivo. Dado que los cultivos realizados contienen la totalidad de las células móviles presentes en la CP pero no las células fijas, cabe la posibilidad de que las células mesoteliales que recubren la cavidad, y/o células especializadas localizadas en el omento, sean necesarias, en tanto superficie de adhesión y/o de origen de señales, para que los macrófagos de CP puedan proliferar en respuesta a la IL-4.

6 Conclusiones

En esta tesis se demostró que las células T $CD4^+$ con fenotipo V presentes en la CP expresan CD40L en superficie de forma constitutiva, en ratones WT, y en mayores niveles en ratones CD40 KO. También se mostró que, aunque los macrófagos peritoneales pueden entrar en contacto con este CD40L y regularlo negativamente en forma dependiente de CD40, esta interacción no modifica la capacidad de los macrófagos para responder funcionalmente a la estimulación con IL-4. Al mismo tiempo, se hicieron hallazgos inesperados que sugieren que el CD40L constitutivo podría ser necesario para la localización o retención de las células T V en la CP, por interacción con CD40 expresado en células que posiblemente no serían macrófagos.

Por otro lado, se observó que tanto los agonistas solubles de CD40 como el CD40L disponible en un contexto de infección, presumiblemente inducido tras el reconocimiento específico de antígeno, actúan como reguladores negativos de las respuestas de macrófagos inducidas por IL-4 (y probablemente IL-13).

7 Perspectivas

Si bien esta tesis buscó abarcar distintos tipos de agonistas de CD40L y realizar un estudio comparativo de su influencia sobre las respuestas de los macrófagos en contextos de tipo 2, se hizo especial foco en el CD40L presente en condiciones basales en la CP, como se refleja en el volumen de trabajo dedicado a este objetivo. En ese sentido, aunque los resultados presentados en las Secciones 1 y 2 fueron en general negativos, de forma inesperada abrieron la puerta a nuevas hipótesis que podrían llevar a establecer un papel de la interacción CD40–CD40L en la localización de las células T V en la CP, como se plantea en la Sección 4. Por lo tanto, las perspectivas a corto y mediano plazo se enfocan en esta nueva línea de investigación, con planteos experimentales ya definidos, algunos de los cuales se comentan a continuación.

En primer lugar, se planea realizar una caracterización más amplia de la presencia de células T $CD4^+$ y $CD8^+$, discriminadas por sus subtipos, en otros sitios no linfoides, como órganos sólidos y cavidades distintas a la CP, en ratones deficientes para CD40 en comparación con animales WT. Esto permitirá determinar si la ausencia de células T V es un fenómeno específico de la CP o si también se observa en otros compartimentos no linfoides. Adicionalmente, se planea incorporar a estos análisis la evaluación en ratones CD40L KO, de modo que, si los resultados son similares a los observados en los CD40 KO, se fortalecerá la hipótesis de un papel directo del CD40L constitutivo en el fenómeno observado, descartando una posible acción mediada por receptores alternativos de CD40L. También se planea, mediante ensayos de transferencia adoptiva, usando vía intravenosa o intraperitoneal, de células T $CD4^+$ V o $CD8^+$ V, provenientes de ratones WT y marcadas fluorescentemente, a receptores WT previamente tratados o no con anticuerpo bloqueante de CD40L, evaluar si la interacción CD40–CD40L influye en el ingreso a, o permanencia en, la CP u órganos sólidos de estas células. Por otro lado, establecimos un contacto con grupo de Gabriel Victora (Rockefeller University, Estados Unidos) para detectar interacciones *in vivo* entre CD40 y CD40L constitutivo en un sistema sofisticado de ratones transgénicos denominado LIPSTIC (por sus siglas en inglés, *Labelling Immune Partnerships by SorTagging Intercellular Contacts*). Este método se basa en la transferencia enzimática de un sustrato biotinilado que ocurre como consecuencia del contacto físico entre el receptor (CD40) y su ligando (CD40L), dejando una marca detectable en aquellas células que interactuaron con CD40L (328). Adicionalmente, si los datos obtenidos sugieren que la interacción CD40–CD40L está más relacionada con la permanencia de las células T V en la CP que con su ingreso, hipótesis que consideramos probable, planeamos estudiar el fenotipo de las DC en ratones CD40 KO y WT tratados con el anticuerpo bloqueante de CD40L en comparación con los

respectivos controles, con el fin de determinar si existen cambios en la expresión de MHC, moléculas coestimuladoras y/o moléculas de adhesión celular que respalden la hipótesis de una interacción tripartita entre DC, células T $CD4^+$ V y T $CD8^+$ V. Además, planeamos a futuro realizar ensayos de transferencia de DC para evaluar si estas células actúan como blanco del CD40L constitutivo y así permitan la retención de las células T en la CP.

De la tesis también surgió la hipótesis de que el CD40L, incluyendo su forma constitutiva, pueda ser una señal para la diferenciación de monocitos a macrófagos. Más en general, sería de interés determinar si existen efectos de CD40L constitutivo sobre monocitos.

Por otro lado, si bien la prioridad de investigación posterior a esta tesis se centra en el CD40L constitutivo, quedaron pendientes algunos análisis relacionados con el efecto de los agonistas exógenos de CD40, cuyo estudio podría enriquecer significativamente la interpretación de los resultados obtenidos. En primer lugar, sería conveniente utilizar el anticuerpo agonista en simultáneo con la transferencia de macrófagos WT o CD40 KO a receptores WT, en presencia o ausencia de IL-4. De esta forma, al comparar el fenotipo de los macrófagos transferidos en respuesta a IL-4 en presencia de anticuerpo agonista, podríamos evaluar qué parte del efecto inhibitorio observado sobre las respuestas a IL-4 se debe a una acción directa del agonista sobre los macrófagos y qué parte se debe a una posible influencia del IFN-γ generado por las células T $CD4^+$, inducida por la presencia de IL-12 tras la señalización conjunta de IL-4 y CD40 en los macrófagos.

Finalmente, sería relevante profundizar en el estudio del CD40L inducido durante la presentación de antígeno y su efecto sobre las respuestas de los macrófagos en el contexto de infecciones por helmintos. En este sentido, resultaría pertinente analizar el fenotipo de los macrófagos en el sitio anatómico donde reside el parásito en estudio. En el caso de la infección por *H. polygyrus*, estudiada en esta tesis, podría estudiarse el fenotipo de los macrófagos intestinales, en presencia *vs* ausencia del anticuerpo bloqueante de CD40L. Además, considerando la practicidad de trabajar con macrófagos de cavidades, se podrían implementar experimentos similares utilizando el modelo de infección con *L. sigmodontis*, en el que el parásito se aloja en la cavidad pleural (329), y analizar el fenotipo de los macrófagos allí presentes. Contar con resultados provenientes de dos modelos de infección distintos, centrados en macrófagos de diferentes localizaciones anatómicas, coincidentes o no con el sitio de residencia del parásito, podría aportar una comprensión más profunda acerca de cómo el CD40L regula la función de los macrófagos M(IL-4) durante las infecciones helmínticas.

8 Bibliografía

1. Gause WC, Urban JF, Stadecker MJ. The immune response to parasitic helminths: Insights from murine models. Trends Immunol. 2003;24(5):269–77.
2. Henry EK, Inclan-Rico JM, Siracusa MC. Type 2 Cytokine Responses: Regulating Immunity to Helminth Parasites and Allergic Inflammation. Curr Pharmacol Reports. 2017;3(6):346–59.
3. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, et al. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. Immunol Rev. 2004;201(1):139–55.
4. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. Nat Rev Immunol. 2007;7(12):975–87.
5. Vignali DAA, Bickle PCQD, Cobbold S, Waldmannt H, Taylor MG. A role for CD4 + but not CD8 + T cells in immunity to Schistosoma mansoni induced by 20 krad-irradiated and Ro 11-3128-terminated infections. Immunology. 1989;466–72.
6. Katona IM, Urban JF, Finkelman FD. The role of L3T4+ and Lyt-2+ T cells in the IgE response and immunity to Nippostrongylus brasiliensis. J Immunol. 1988;140(9):3206–11.
7. Barlow JL, McKenzie ANJ. Nuocytes: expanding the innate cell repertoire in type-2 immunity. J Leukoc Biol. 2011;90(5):867–74.
8. Voehringer D, Reese TA, Huang X, Shinkai K, Locksley RM. Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. J Exp Med. 2006;203(6):1435–46.
9. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TKA, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. Nature. 2010;464(7293):1367–70.
10. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, et al. Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit+Sca-1+ lymphoid cells. Nature. 2010;463(7280):540–4.
11. Price AE, Liang H, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eisley CJ, Erle DJ, et al. Systemically dispersed innate IL-13–expressing cells in type 2 immunity. Proc Natl Acad Sci. 2010;107(25):11489–94.
12. Saenz SA, Siracusa MC, Perrigoue JG, Spencer SP, Urban Jr JF, Tocker JE, et al. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes TH2 cytokine responses. Nature. 2010;464(7293):1362–6.
13. Tabata Y, Hershey GKK. IL-13 receptor isoforms: Breaking through the complexity. Curr Allergy Asthma Rep. 2007;7(5):338–45.

14. Suzuki A, Leland P, Joshi BH, Puri RK. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. Cytokine. 2015;75(1):79–88.

15. Urban JF, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Madden KB, Morris SC, Collins M, et al. IL-13, IL-4Rα, and Stat6 Are Required for the Expulsion of the Gastrointestinal Nematode Parasite Nippostrongylus brasiliensis. Immunity. 1998;8(2):255–64.

16. Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in TH1-TH2 responses. Nat Immunol. 2004;5(11):1157–65.

17. Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, et al. Inhibition of Th1 Development Mediated by GATA-3 through an IL-4-Independent Mechanism. Immunity. 1998;9(5):745–55.

18. Farrar JD, Ouyang W, Löhning M, Assenmacher M, Radbruch A, Kanagawa O, et al. An Instructive Component in T Helper Cell Type 2 (Th2) Development Mediated by Gata-3. J Exp Med. 2001;193(5):643–50.

19. Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood: Epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. Immunol Rev. 2008;226(1):172–90.

20. Hasnain SZ, Evans CM, Roy M, Gallagher AL, Kindrachuk KN, Barron L, et al. Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. J Exp Med. 2011;208(5):893–900.

21. Herbert DR, Yang J, Hogan SP, Groschwitz K, Khodoun M, Munitz A, et al. Intestinal epithelial cell secretion of RELM-β protects against gastrointestinal worm infection. J Exp Med. 2009;206(13):2947–57.

22. Artis D, Wang ML, Keilbaugh SA, He W, Brenes M, Swain GP, et al. RELMβ/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci. 2004;101(37):13596–600.

23. Akiho H, Blennerhassett P, Deng Y, Collins SM. Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. Am J Physiol Liver Physiol. 2002;282(2):G226–32.

24. Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grencis RK. Accelerated Intestinal Epithelial Cell Turnover: A New Mechanism of Parasite Expulsion. Science (80-). 2005;308(5727):1463–5.

25. Anthony RM, Jr JFU, Alem F, Hamed HA, Cristina T. Memory TH 2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. Nat Med. 2006;12(8):955–60.

26. Gazzinelli-Guimaraes PH, Jones SM, Voehringer D, Mayer-Barber KD, Samarasinghe AE. Eosinophils as modulators of host defense during parasitic, fungal, bacterial, and viral infections. J Leukoc Biol. 2024;116(6):1301–23.

27. Sabin EA, Kopf MA, Pearce EJ. Schistosoma mansoni egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. J Exp Med. 1996;184(5):1871–8.

28. Knott ML, Matthaei KI, Giacomin PR, Wang H, Foster PS, Dent LA. Impaired resistance in early secondary Nippostrongylus brasiliensis infections in mice with defective eosinophilopoeisis. Int J Parasitol. 2007;37(12):1367–78.

29. Spencer LA, Weller PF. Eosinophils and Th2 immunity : contemporary insights. Immunol Cell Biol. 2010;88(3):250–6.

30. Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES, et al. Basophils Produce IL-4 and Accumulate in Tissues after Infection with a Th2-inducing Parasite. J Exp Med. 2004;200(4):507–17.

31. Stear M, Preston S, Piedrafita D, Donskow-Łysoniewska K. The Immune Response to Nematode Infection. Int J Mol Sci. 2023;24(3):1–18.

32. Babu S, Bhat SQ, Pavan Kumar N, Lipira AB, Kumar S, Karthik C, et al. Filarial Lymphedema Is Characterized by Antigen-Specific Th1 and Th17 Proinflammatory Responses and a Lack of Regulatory T Cells. Fujiwara RT, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2009 Apr 21;3(4):e420.

33. White MPJ, McManus CM, Maizels RM. Regulatory T-cells in helminth infection: induction, function and therapeutic potential. Immunology. 2020;160(3):248–60.

34. Finney CAM, Taylor MD, Wilson MS, Maizels RM. Expansion and activation of CD4 + CD25 + regulatory T cells in Heligmosomoides polygyrus infection. Eur J Immunol. 2007;37(7):1874–86.

35. Rausch S, Huehn J, Kirchhoff D, Rzepecka J, Schnoeller C, Pillai S, et al. Functional Analysis of Effector and Regulatory T Cells in a Parasitic Nematode Infection. Infect Immun. 2008;76(5):1908–19.

36. Fleming J, Fabry Z. The hygiene hypothesis and multiple sclerosis. Ann Neurol. 2007;61(2):85–9.

37. Elliott DE, Summers RW, Weinstock J V. Helminths as governors of immune-mediated inflammation. Int J Parasitol. 2007;37(5):457–64.

38. Maizels RM. Infections and allergy — helminths, hygiene and host immune regulation. Curr Opin Immunol. 2005;17(6):656–61.

39. Fallon PG, Mangan NE. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. Nat Rev Immunol. 2007;7(3):220–30.

40. McSorley HJ, Harcus YM, Murray J, Taylor MD, Maizels RM. Expansion of Foxp3+ Regulatory T Cells in Mice Infected with the Filarial Parasite Brugia malayi. J Immunol. 2008;181:6456–66.

41. Grainger JR, Smith KA, Hewitson JP, McSorley HJ, Harcus Y, Filbey KJ, et al. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory

function through the TGF-β pathway. J Exp Med. 2010;207:2331–41.

42. Díaz A, Allen JE. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. Eur J Immunol. 2007;37(12):3319–26.

43. Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. Nat Rev Immunol. 2011;11(6):375–88.

44. Reynolds LA, Filbey KJ, Maizels RM. Immunity to the model intestinal helminth parasite Heligmosomoides polygyrus. Semin Immunopathol. 2012;34(6):829–46.

45. Bansemir AD, Sukhdeo MVK. The food resource of adult Heligmosomoides polygyrus in the small intestine. J Parasitol. 1994;80(1):24–8.

46. Urban JF, Katona IM, Finkelman FD. Heligmosomoides polygyrus: CD4+ but not CD8+ T cells regulate the IgE response and protective immunity in mice. Exp Parasitol. 1991;73(4):500–11.

47. Svetić A, Madden KB, Zhou XD, Lu P, Katona IM, Finkelman FD, et al. A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. J Immunol. 1993;150(8):3434–41.

48. Urban JF, Maliszewski CR, Madden KB, Katona IM, Finkelman FD. IL-4 treatment can cure established gastrointestinal nematode infections in immunocompetent and immunodeficient mice. J Immunol. 1995;154(9):4675–84.

49. Mohrs K, Harris DP, Lund FE, Mohrs M. Systemic Dissemination and Persistence of Th2 and Type 2 Cells in Response to Infection with a Strictly Enteric Nematode Parasite. J Immunol. 2005;175(8):5306–13.

50. Doligalska M, Donskow-Schmelter K, Rzepecka J, Drela N. Reduced apoptosis in BALB/c mice infected with Heligmosomoides polygyrus. Parasite Immunol. 2007;29(6):283–91.

51. McCoy KD, Stoel M, Stettler R, Merky P, Fink K, Senn BM, et al. Polyclonal and Specific Antibodies Mediate Protective Immunity against Enteric Helminth Infection. Cell Host Microbe. 2008;4(4):362–73.

52. Pritchard DI, Williams DJ, Behnke JM, Lee TD. The role of IgG1 hypergammaglobulinaemia in immunity to the gastrointestinal nematode Nematospiroides dubius. The immunochemical purification, antigen-specificity and in vivo anti-parasite effect of IgG1 from immune serum. Immunology. 1983;49(2):353–65.

53. Murai M, Krause P, Cheroutre H, Kronenberg M. Regulatory T-cell stability and plasticity in mucosal and systemic immune systems. Mucosal Immunol. 2010;3(5):443–9.

54. Mizoguchi A, Bhan AK. A Case for Regulatory B Cells. J Immunol. 2006;176(2):705–10.

55. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. Nat Immunol. 2013;14(10):986–95.

56. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. Immunity. 2016;44(3):439–49.

57. Sawai CM, Babovic S, Upadhaya S, Knapp DJHF, Lavin Y, Lau CM, et al. Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals. Immunity. 2016;45:597–609.

58. Jenkins SJ, Hume DA. Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. Trends Immunol. 2014;35(8):358–67.

59. Sester DP, Beasley SJ, Sweet MJ, Fowles LF, Cronau SL, Stacey KJ, et al. Bacterial/CpG DNA Down-Modulates Colony Stimulating Factor-1 Receptor Surface Expression on Murine Bone Marrow-Derived Macrophages with Concomitant Growth Arrest and Factor-Independent Survival. J Immunol. 1999;163:6541–50.

60. Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. Curr Opin Immunol. 2006;18(1):39–48.

61. Jenkins SJ, Ruckerl D, Thomas GD, Hewitson JP, Duncan S, Brombacher F, et al. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. J Exp Med. 2013;210(11):2477–91.

62. Tagliani E, Shi C, Nancy P, Tay CS, Pamer EG, Erlebacher A. Coordinate regulation of tissue macrophage and dendritic cell population dynamics by CSF-1. J Exp Med. 2011;208:1901–16.

63. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H-H, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. Annu Rev Immunol. 2005;23(1):901–44.

64. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxid an macrophage function. Annu Rev Immunol. 1997;15(1):323–50.

65. Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim JY. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. Immunol Res. 2012;53:11–24.

66. Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. ScientificWorldJournal. 2011;11:2391–402.

67. Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M, Allen JE. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. BMC Immunol. 2002;3(1):7.

68. Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol. 2003;3(1):23–35.

69. Nair MG, Guild KJ, Artis D. Novel Effector Molecules in Type 2 Inflammation: Lessons Drawn from Helminth Infection and Allergy. J Immunol. 2006;177:1393–9.

70. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. Immunity. 2014;41(1):14–20.

71. Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. Trends Immunol. 2013;34(5):216–23.

72. Rőszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. Keisari Y, editor. Mediators Inflamm. 2015;2015(1).

73. Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and Interleukin-13-Mediated Alternatively Activated Macrophages: Roles in Homeostasis and Disease. Annu Rev Immunol. 2013;31(1):317–43.

74. Borthwick LA, Barron L, Hart KM, Vannella KM, Thompson RW, Oland S, et al. Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis. Mucosal Immunol. 2016;9:38–55.

75. Chen F, Liu Z, Wu W, Rozo C, Bowdridge S, Millman A, et al. An essential role for T H 2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. Nat Med. 2012;18:260–6.

76. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, Van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of T H2 inflammation. Science (80-). 2011;332(6035):1284–8.

77. Minutti CM, Jackson-Jones LH, García-Fojeda B, Knipper JA, Sutherland TE, Logan N, et al. Local amplifiers of IL-4Ra-mediated macrophage activation promote repair in lung and liver. Science (80-). 2017;356(6342):1076–80.

78. Braune J, Weyer U, Hobusch C, Mauer J, Brüning JC, Bechmann I, et al. IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. J Immunol. 2017;198(7):2927–34.

79. Zheng C, Yang Q, Xu C, Shou P, Cao J, Jiang M, et al. CD11b regulates obesity-induced insulin resistance via limiting alternative activation and proliferation of adipose tissue macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(52):7239–48.

80. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. 2004;25(12):677–86.

81. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. J Leukoc Biol. 2006;80:1298–307.

82. Raes G, De Baetselier P, Noël W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh. G. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. J Leukoc Biol. 2002;71:597–602.

83. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, et

al. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of l -Arginine Metabolism. J Immunol. 2001;167:6533–44.

84. Kreider T, Anthony RM, Urban JF, Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. Curr Opin Immunol. 2007;19(4):448–53.

85. Jin HM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Kirkpatrick RB, Rosenberg M. Genetic characterization of the murine Ym1 gene and identification of a cluster of highly homologous genes. Genomics. 1998;54:316–22.

86. Owhashi M, Arita H, Hayai N. Identification of a novel eosinophil chemotactic cytokine (ECF-L) as a chitinase family protein. J Biol Chem. 2000;275:1279–86.

87. Owhashi M. Production of eosinophil chemotactic factor by CD8+ T-cells in Toxocara canis-infected mice. Parasitol Res. 1997;84:136–8.

88. Sun YJ, Chang NCA, Hung SI, Chien Chang A, Chou CC, Hsiao CD. The Crystal Structure of a Novel Mammalian Lectin, Ym1, Suggests a Saccharide Binding Site. J Biol Chem. 2001;276:17507–14.

89. Chang NCA, Hung SI, Hwa KY, Kato I, Chen JE, Liu CH, et al. A Macrophage Protein, Ym1, Transiently Expressed during Inflammation Is a Novel Mammalian Lectin. J Biol Chem. 2001;276:17497–506.

90. Harbord M, Novelli M, Canas B, Power D, Davis C, Godovac-Zimmermann J, et al. Ym1 is a neutrophil granule protein that crystallizes in p47phox-deficient mice. J Biol Chem. 2002;277:5468–75.

91. Goren I, Pfeilschifter J, Frank S. Uptake of neutrophil-derived Ym1 protein distinguishes wound macrophages in the absence of interleukin-4 signaling in murine wound healing. Am J Pathol. 2014;184:3249–61.

92. Nair MG, Gallagher IJ, Taylor MD, Loke P, Coulson PS, Wilson RA, et al. Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. Infect Immun. 2005;73:385–94.

93. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. EMBO J. 2000;19:4046–55.

94. Nair MG, Cochrane DW, Allen JE. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. Immunol Lett. 2003;85:173–80.

95. Bouffi C, Rochman M, Zust CB, Stucke EM, Kartashov A, Fulkerson PC, et al. IL-33 Markedly Activates Murine Eosinophils by an NF-κB–Dependent Mechanism Differentially Dependent upon an IL-4–Driven Autoinflammatory Loop. J Immunol. 2013;191:4317–25.

96. Liu T, Dhanasekaran SM, Jin H, Hu B, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, et al. FIZZ1 Stimulation of Myofibroblast Differentiation. Am J Pathol. 2004;164:1315–26.

97. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. Eur J Pharmacol. 2020 Jun;877:173090.

98. van Baal JOA., Van de Vijver KK, Nieuwland R, van Noorden CJF, van Driel WJ, Sturk A, et al. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. Tissue Cell. 2017;49(1):95–105.

99. Zindel J, Peiseler M, Hossain M, Deppermann C, Lee WY, Haenni B, et al. Primordial GATA6 macrophages function as extravascular platelets in sterile injury. Science (80-). 2021;371(6533).

100. Zhang N, Czepielewski RS, Jarjour NN, Erlich EC, Esaulova E, Saunders BT, et al. Expression of factor V by resident macrophages boosts host defense in the peritoneal cavity. J Exp Med. 2019;216:1291–300.

101. Avraham-Chakim L, Elad D, Zaretsky U, Kloog Y, Jaffa A, Grisaru D. Fluid-Flow Induced Wall Shear Stress and Epithelial Ovarian Cancer Peritoneal Spreading. Ast G, editor. PLoS One. 2013;8(4):e60965.

102. Liu M, Silva-Sanchez A, Randall TD, Meza-Perez S. Specialized immune responses in the peritoneal cavity and omentum. J Leukoc Biol. 2021;109:717–29.

103. Ardavín C, Alvarez-Ladrón N, Ferriz M, Gutiérrez-González A, Vega-Pérez A. Mouse Tissue-Resident Peritoneal Macrophages in Homeostasis, Repair, Infection, and Tumor Metastasis. Adv Sci. 2023;10(11).

104. Bella Á, Di Trani CA, Fernández-Sendin M, Arrizabalaga L, Cirella A, Teijeira Á, et al. Mouse Models of Peritoneal Carcinomatosis to Develop Clinical Applications. Cancers (Basel). 2021;13(5):963.

105. Jackson-Jones LH, Bénézech C. FALC stromal cells define a unique immunological niche for the surveillance of serous cavities. Curr Opin Immunol. 2020;64:42–9.

106. Krishnan V, Tallapragada S, Schaar B, Kamat K, Chanana AM, Zhang Y, et al. Omental macrophages secrete chemokine ligands that promote ovarian cancer colonization of the omentum via CCR1. Commun Biol. 2020;3(1):524.

107. Bain CC, Jenkins SJ. The biology of serous cavity macrophages. Cell Immunol. 2018 Aug;330:126–35.

108. Smith FL, Baumgarth N. B-1 cell responses to infections. Curr Opin Immunol. 2019;57:23–31.

109. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. Cell. 2014;157:832–44.

110. Kang S-H, Jin B-R, Kim H-J, Seo G-Y, Jang Y-S, Kim S-J, et al. Lactoferrin Combined with Retinoic Acid Stimulates B1 Cells to Express IgA Isotype and Gut-homing Molecules. Immune Netw. 2015;15:37–43.

111. Jackson-Jones LH, Smith P, Portman JR, Magalhaes MS, Mylonas KJ, Vermeren MM, et al. Stromal Cells Covering Omental Fat-Associated Lymphoid Clusters Trigger Formation of Neutrophil Aggregates to Capture Peritoneal Contaminants. Immunity. 2020;52:700-715.e6.

112. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. Front Immunol. 2017;8.

113. Rana BMJ, Jou E, Barlow JL, Rodriguez-Rodriguez N, Walker JA, Knox C, et al. A stromal cell niche sustains ILC2-mediated type-2 conditioning in adipose tissue. J Exp Med. 2019;216:1999–2009.

114. Bénézech C, Jackson-Jones LH. ILC2 Orchestration of Local Immune Function in Adipose Tissue. Front Immunol. 2019;10.

115. Mahlakõiv T, Flamar A-L, Johnston LK, Moriyama S, Putzel GG, Bryce PJ, et al. Stromal cells maintain immune cell homeostasis in adipose tissue via production of interleukin-33. Sci Immunol. 2019;4(35).

116. Spallanzani RG, Zemmour D, Xiao T, Jayewickreme T, Li C, Bryce PJ, et al. Distinct immunocyte-promoting and adipocyte-generating stromal components coordinate adipose tissue immune and metabolic tenors. Sci Immunol. 2019;4(35).

117. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. Circ Res. 2010;107:650–8.

118. Molofsky AB, Van Gool F, Liang HE, Van Dyken SJ, Nussbaum JC, Lee J, et al. InterleuKin-33 And Interferon-Γ Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation During Immune Perturbation. Immunity. 2015;43:161–74.

119. Rosas M, Davies LC, Giles PJ, Liao C Te, Kharfan B, Stone TC, et al. The transcription factor Gata6 links tissue macrophage phenotype and proliferative renewal. Science (80-). 2014;344:645–8.

120. Casanova-Acebes M, Menéndez-Gutiérrez MP, Porcuna J, Álvarez-Errico D, Lavin Y, García A, et al. RXRs control serous macrophage neonatal expansion and identity and contribute to ovarian cancer progression. Nat Commun. 2020;11(1):1655.

121. Liu Z, Gu Y, Chakarov S, Bleriot C, Kwok I, Chen X, et al. Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells. Cell. 2019;178(6):1509–25.

122. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. Nat Immunol. 2012;13:1118–28.

123. Nishi C, Toda S, Segawa K, Nagata S. Tim4- and MerTK-Mediated Engulfment of Apoptotic Cells by Mouse Resident Peritoneal Macrophages. Mol Cell Biol. 2014;34:1512–20.

124. Wong K, Valdez PA, Tan C, Yeh S, Hongo J-A, Ouyang W. Phosphatidylserine receptor Tim-4 is essential for the maintenance of the homeostatic state of resident peritoneal macrophages. Proc Natl Acad Sci. 2010;107(19):8712–7.

125. Gautier EL, Ivanov S, Lesnik P, Randolph GJ. Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. Blood. 2013;122:2714–22.

126. Okabe Y. Molecular control of the identity of tissue-resident macrophages. Int Immunol. 2018;30(11):485–91.

127. Buechler MB, Kim KW, Onufer EJ, Williams JW, Little CC, Dominguez CX, et al. A Stromal Niche Defined by Expression of the Transcription Factor WT1 Mediates Programming and Homeostasis of Cavity-Resident Macrophages. Immunity. 2019;51:119–30.

128. Ansel KM, Harris RBS, Cyster JG. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. Immunity. 2002;16:67–76.

129. Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S, et al. Conditional Macrophage Ablation Demonstrates That Resident Macrophages Initiate Acute Peritoneal Inflammation. J Immunol. 2005;174:2336–42.

130. Newson J, Stables M, Karra E, Arce-Vargas F, Quezada S, Motwani M, et al. Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. Blood. 2014;124:1748–64.

131. Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese R V., Broxmeyer HE, et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. J Clin Invest. 1997;100:2552–61.

132. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. J Exp Med. 1997;186:1757–62.

133. Kim KW, Williams JW, Wang YT, Ivanov S, Gilfillan S, Colonna M, et al. MHC II+ resident peritoneal and pleural macrophages rely on IRF4 for development from circulating monocytes. J Exp Med. 2016;213:1951–9.

134. Bou Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:2568–73.

135. Bain CC, Hawley CA, Garner H, Scott CL, Schridde A, Steers NJ, et al. Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. Nat Commun. 2016;7.

136. Liao C Te, Rosas M, Davies LC, Giles PJ, Tyrrell VJ, O'Donnell VB, et al. IL-10 differentially controls the infiltration of inflammatory macrophages and antigen-presenting cells during inflammation. Eur J Immunol. 2016;46:2222–32.

137. Louis C, Cook AD, Lacey D, Fleetwood AJ, Vlahos R, Anderson GP, et al. Specific Contributions of CSF-1 and GM-CSF to the Dynamics of the Mononuclear Phagocyte System. J Immunol. 2015;195:134–44.

138. Gautier EL, Ivanov S, Williams JW, Huang SCC, Marcelin G, Fairfax K, et al. Gata6 regulates aspartoacylase expression in resident peritoneal macrophages and controls their survival. J Exp Med. 2014;211:1525–31.

139. Satpathy AT, KC W, Albring JC, Edelson BT, Kretzer NM, Bhattacharya D, et al. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. J Exp Med. 2012;209:1135–52.

140. Meredith MM, Liu K, Darrasse-Jeze G, Kamphorst AO, Schreiber HA, Guermonprez P, et al. Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. J Exp Med. 2012;209:1153–65.

141. Wu X, Briseño CG, Durai V, Albring JC, Haldar M, Bagadia P, et al. Maf b lineage tracing to distinguish macrophages from other immune lineages reveals dual identity of langerhans cells. J Exp Med. 2016;213:2553–65.

142. Cain DW, O'Koren EG, Kan MJ, Womble M, Sempowski GD, Hopper K, et al. Identification of a Tissue-Specific, C/EBPβ-Dependent Pathway of Differentiation for Murine Peritoneal Macrophages. J Immunol. 2013;191:4665–75.

143. Finlay CM, Parkinson JE, Zhang L, Chan BHK, Ajendra J, Chenery A, et al. T helper 2 cells control monocyte to tissue-resident macrophage differentiation during nematode infection of the pleural cavity. Immunity. 2023;56(5):1064–81.

144. Bain CC, Gibson DA, Steers NJ, Boufea K, Louwe PA, Doherty C, et al. Rate of replenishment and microenvironment contribute to the sexually dimorphic phenotype and function of peritoneal macrophages. Sci Immunol. 2020;5(48).

145. Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao C-T, Scurr MJ, Brombacher F, et al. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. Nat Commun. 2013;4(1):1886.

146. Louwe PA, Badiola Gomez L, Webster H, Perona-Wright G, Bain CC, Forbes SJ, et al. Recruited macrophages that colonize the post-inflammatory peritoneal niche convert into functionally divergent resident cells. Nat Commun. 2021;12(1):1770.

147. Vega-Pérez A, Villarrubia LH, Godio C, Gutiérrez-González A, Feo-Lucas L,

Ferriz M, et al. Resident macrophage-dependent immune cell scaffolds drive anti-bacterial defense in the peritoneal cavity. Immunity. 2021;54:2578–94.

148. Grezzi L, Martínez YE, Barrios AA, Díaz Á, Casaravilla C. Characterization of the immunosuppressive environment induced by larval Echinococcus granulosus during chronic experimental infection. Infect Immun. 2024;92.

149. Rückerl D, Campbell SM, Duncan S, Sutherland TE, Jenkins SJ, Hewitson JP, et al. Macrophage origin limits functional plasticity in helminth-bacterial co-infection. PLoS Pathog. 2017;13(3):1–19.

150. Cassado A dos A, de Albuquerque JAT, Sardinha LR, de Buzzo CL, Faustino L, Nascimento R, et al. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. PLoS One. 2011;6.

151. Pavlou S, Wang L, Xu H, Chen M. Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. J Inflamm. 2017;14.

152. Barth MW, Hendrzak JA, Melnicoff MJ, Morahan PS. Review of the macrophage disappearance reaction. J Leukoc Biol. 1995;57(3):361–7.

153. Bellingan GJ, Xu P, Cooksley H, Cauldwell H, Shock A, Bottoms S, et al. Adhesion molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation. J Exp Med. 2002;196:1515–21.

154. Guilliams M, Scott CL. Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? Nat Rev Immunol. 2017;17(7):451–60.

155. Ivanov S, Gallerand A, Gros M, Stunault MI, Merlin J, Vaillant N, et al. Mesothelial cell CSF1 sustains peritoneal macrophage proliferation. Eur J Immunol. 2019;49:2012–8.

156. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. Curr Biol. 2017;27(21):R1147–51.

157. Gracia-Sancho J, Caparrós E, Fernández-Iglesias A, Francés R. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021;18(6):411–31.

158. Shetty S, Lalor PF, Adams DH. Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2018;15(9):555–67.

159. Liu J, Du Y, Xiao X, Tan D, He Y, Qin L. Construction of in vitro liver-on-a-chip models and application progress. Biomed Eng Online. 2024;23(1):33.

160. Kubes P, Jenne C. Immune Responses in the Liver. Annu Rev Immunol. 2018;36(1):247–77.

161. Lynch RW, Hawley CA, Pellicoro A, Bain CC, Iredale JP, Jenkins SJ. An

efficient method to isolate Kupffer cells eliminating endothelial cell contamination and selective bias. J Leukoc Biol. 2018;104(3):579–86.

162. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. Nat Rev Immunol. 2010;10(11):753–66.

163. Schulz C, Perdiguero EG, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. Science (80-). 2012;335:86–90.

164. Cecchini MG, Dominguez MG, Mocci S, Wetterwald A, Felix R, Fleisch H, et al. Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. Development. 1994;120:1357–72.

165. Sherr CJ, Rettenmier CW, Sacca R, Roussel MF, Look AT, Stanley ER. The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF 1. Cell. 1985;41:665–76.

166. Yamamoto T, Kaizu C, Kawasaki T, Hasegawa G, Umezu H, Ohashi R, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for repopulation and differentiation of Kupffer cells but not for splenic red pulp macrophages in osteopetrotic (op/op) mice after macrophage depletion. Cell Tissue Res. 2008;332:245–56.

167. Buechler MB, Fu W, Turley SJ. Fibroblast-macrophage reciprocal interactions in health, fibrosis, and cancer. Immunity. 2021;54(5):903–15.

168. Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saeys Y, De Prijck S, et al. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. Nat Commun. 2016;7(1):10321.

169. Zhao Y, Zhao S, Liu S, Ye W, Chen W. Kupffer cells, the limelight in the liver regeneration. Int Immunopharmacol. 2025;146:113808.

170. Blériot C, Dupuis T, Jouvion G, Eberl G, Disson O, Lecuit M. Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. Immunity. 2015;42:145–58.

171. Horst AK, Neumann K, Diehl L, Tiegs G. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. Cell Mol Immunol. 2016;13(3):277–92.

172. Robinson MW, Harmon C, O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. Cell Mol Immunol. 2016;13(3):267–76.

173. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol. 2000;67(1):2–17.

174. Banchereau J, Dubois B, Fayette J, Burdin N, Brière F, Miossec P, et al. Functional CD40 Antigen on B Cells, Dendritic Cells and Fibroblasts. Adv Exp Med Biol. 1995;378:79–83.

175. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. Science (80-). 2002;297:2060–3.

176. Kooten C Van, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. Curr Opin Immunol. 1997;9:330–7.

177. Graf D, Müller S, Korthäuer U, van Kooten C, Weise C, Kroczek RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. Eur J Immunol. 1995;25:1749–54.

178. Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C, Lecoanet-Henchoz S, Graber P, Durandy A, et al. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. J Biol Chem. 1995;270:7025–8.

179. Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, et al. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: The CD40-CD40 ligand interaction. J Exp Med. 1997;185:2053–60.

180. Bishop GA, Moore CR, Xie P, Stunz LL, Kraus ZJ. TRAF Proteins in CD40 Signaling. In: TNF Receptor Associated Factors (TRAFs). New York, NY: Springer New York; 2007. p. 131–51.

181. Säemann MD, Diakos C, Kelemen P, Kriehuber E, Zeyda M, Böhmig GA, et al. Prevention of CD40-Triggered Dendritic Cell Maturation and Induction of T-Cell Hyporeactivity by Targeting of Janus Kinase 3. Am J Transplant. 2003;3:1341–9.

182. Säemann M., Kelemen P, Zeyda M, Böhmig G, Staffler G, Zlabinger G. CD40 triggered human monocyte-derived dendritic cells convert to tolerogenic dendritic cells when JAK3 activity is inhibited. Transplant Proc. 2002;34(5):1407–8.

183. Richards DM, Sefrin JP, Gieffers C, Hill O, Merz C. Concepts for agonistic targeting of CD40 in immuno-oncology. Hum Vaccin Immunother. 2020;16(2):377–87.

184. Snijders A, Kalinski P, Hilkens CMU, Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. Int Immunol. 1998;10:1593–8.

185. Danese S. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. Gut. 2004;53(7):1035–43.

186. Wagner DH, Stout RD, Suttles J. Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis. Eur J Immunol. 1994;24:3148–54.

187. Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, Flavell RA. Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. J Immunol. 1996;156:8–11.

188. Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D.

Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. J Immunol. 1995;155:4917–25.

189. Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: Regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. J Exp Med. 1993;178:669–74.

190. Mukundan L, Bishop GA, Head KZ, Zhang L, Wahl LM, Suttles J. TNF Receptor-Associated Factor 6 Is an Essential Mediator of CD40-Activated Proinflammatory Pathways in Monocytes and Macrophages. J Immunol. 2005;174:1081–90.

191. Kennedy MK, Picha KS, Fanslow WC, Grabstein KH, Alderson MR, Clifford KN, et al. CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. Eur J Immunol. 1996;26:370–8.

192. Shu U, Kiniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, Hakimi J, et al. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. Eur J Immunol. 1995;25:1125–8.

193. Kornbluth RS, Kee K, Richman DD. CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1-suppressive β-chemokines. Proc Natl Acad Sci. 1998;95(9):5205–10.

194. Ferrari-Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. Human lung tissue macrophages, but not alveolar macrophages, express matrix metalloproteinases after direct contact with activated T lymphocytes. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001;24:442–51.

195. Wu L, Fan J, Matsumoto SI, Watanabe T. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2000;269:808–15.

196. Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: Induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. Circulation. 1997;96:396–9.

197. Tian L, Noelle RJ, Lawrence DA. Activated T cells enhance nitric oxide production by murine splenic macrophages through gp39 and LFA-1. Eur J Immunol. 1995;25:306–9.

198. Brenner B, Koppenhoefer U, Grassmé H, Kun J, Lang F, Gulbins E. Evidence for a novel function of the CD40 ligand as a significant molecule in T-lymphocyte. FEBS Lett. 1997;417:301–6.

199. Brenner B, Koppenhoefer U, Lepple-Wienhues A, Grassmé H, Müller C, Speer CP, et al. The CD40 ligand directly activates T-Lymphocytes via tyrosine phosphorylation dependent PKC activation. Biochem Biophys Res

Commun. 1997;239:11–7.

200. van Os BW, Vos WG, Bosmans LA, van Tiel CM, Toom M den, Beckers L, et al. CD40L modulates CD4 + T-cell activation through receptor for activated C kinase 1. Eur J Immunol. 2023;53(12).

201. Fullard J. The Role of the Platelet Glycoprotein IIb / IIIa in Thrombosis and Haemostasis. Curr Pharm Des. 2005;10:1567–76.

202. Scarborough RM, Rose JW, Hsu MA, Phillips DR, Fried VA, Campbell AM, et al. Barbourin: A GPIIb-IIIa-Specific integrin antagonist from the venom of Sistrurus M. Barbouri. J Biol Chem. 1991;266:9359–62.

203. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, et al. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. Circulation. 2007;115:1571–80.

204. Léveillé C, Bouillon M, Guo W, Bolduc J, Sharif-Askari E, El-Fakhry Y, et al. CD40 ligand binds to α5β1 integrin and triggers cell signaling. J Biol Chem. 2007;282:5143–51.

205. El Fakhry Y, Alturaihi H, Yacoub D, Liu L, Guo W, Leveillé C, et al. Functional interaction of CD154 protein with α5β1 integrin is totally independent from its binding to αIIbβ3 integrin and CD40 molecules. J Biol Chem. 2012;287:18055–66.

206. Hassan GS, Merhi Y, Mourad WM. CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. Trends Immunol. 2009;30(4):165–72.

207. Tang T, Rosenkranz A, Assmann KJM, Goodman MJ, Gutierrez-Ramos JC, Carroll MC, et al. A role for Mac-1 (CDIIb/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fcγ receptor- dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. J Exp Med. 1997;186:1853–63.

208. Lee BO, Haynes L, Eaton SM, Swain SL, Randall TD. The biological outcome of CD40 signaling is dependent on the duration of CD40 ligand expression: Reciprocal regulation by interleukin (IL)-4 and IL-12. J Exp Med. 2002;196(5):693–704.

209. Casamayor-Palleja M, Khan M, MacLennan ICM. A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. J Exp Med. 1995;181:1293–301.

210. Koguchi Y, Thauland TJ, Slifka MK, Parker DC. Preformed CD40 ligand exists in secretory lysosomes in effector and memory CD4+ T cells and is quickly expressed on the cell surface in an antigen-specific manner. Blood. 2007;110(7):2520–7.

211. van Kooten C, Gaillard C, Galizzi J -P, Hermann P, Fossiez F, Banchereau J, et al. B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by

lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40. Eur J Immunol. 1994;24(4):787–92.

212. Ludewig B, Henn V, Schröder JM, Graf D, Kroczek RA. Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells. Eur J Immunol. 1996;26(12):3137–43.

213. Ingoglia G, Yalamanoglu A, Pfefferlé M, Dubach IL, Schaer CA, Valkova K, et al. Line-selective macrophage activation with an anti-CD40 antibody drives a hemophagocytic syndrome in mice. Blood Adv. 2020;4:2751–61.

214. Byrne KT, Vonderheide RH. CD40 Stimulation Obviates Innate Sensors and Drives T Cell Immunity in Cancer. Cell Rep. 2016;15:2719–32.

215. Yellin MJ, Sippel K, Inghirami G, Covey LR, Lee JJ, Sinning J, et al. CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. J Immunol. 1994;152:598–608.

216. Rousset F, Garcia E, Banchereau J. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. J Exp Med. 1991;173:705–10.

217. Vallé A, Zuber CE, Defrance T, Djossou O, Riem M De, Banchereau J. Activation of human B lymphocytes through CD40 and interleukin 4. Eur J Immunol. 1989;19(8):1463–7.

218. Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey H, Aubry JP, Elson G, Edgerton MD, et al. Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. J Biol Chem. 1996;271:5965–7.

219. Koguchi Y, Buenafe AC, Thauland TJ, Gardell JL, Bivins-Smith ER, Jacoby DB, et al. Preformed CD40L is stored in Th1, Th2, Th17, and T follicular helper cells as well as CD4 +8 - thymocytes and invariant NKT cells but not in Treg cells. PLoS One. 2012;7(2).

220. Lesley R, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG. Naive CD4 T cells constitutively express CD40L and augment autoreactive B cell survival. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(28):10717–22.

221. Armant M, Armitage R, Boiani N, Delespesse G, Sarfati M. Functional CD40 ligand expression on T lymphocytes in the absence of T cell receptor engagement: Involvement in interleukin-2 induced interleukin-12 and interferon-γ production. Eur J Immunol. 1996;26:1430–4.

222. Matthews NC, Wadhwa M, Bird C, Borras FE, Navarrete C V. Sustained Expression of CD154 (CD40L) and Proinflammatory Cytokine Production by Alloantigen-Stimulated Umbilical Cord Blood T Cells. J Immunol. 2000;164:6206–12.

223. Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, et al. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to

CD154 expression. Nat Med. 2005;11:1118–24.

224. Díaz Á, González-Alayón I, Pérez-Torrado V, Suárez-Martins M. CD40-CD154: A perspective from type 2 immunity. Semin Immunol. 2021;53:101528.

225. MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ. CD8− Dendritic Cell Activation Status Plays an Integral Role in Influencing Th2 Response Development. J Immunol. 2001;167:1982–8.

226. Straw AD, MacDonald AS, Denkers EY, Pearce EJ. CD154 Plays a Central Role in Regulating Dendritic Cell Activation During Infections That Induce Th1 or Th2 Responses. J Immunol. 2003;170:727–34.

227. Balic A, Smith KA, Harcus Y, Maizels RM. Dynamics of CD11c+ dendritic cell subsets in lymph nodes draining the site of intestinal nematode infection. Immunol Lett. 2009;127:68–75.

228. Mejri N, Müller N, Hemphill A, Gottstein B. Intraperitoneal Echinococcus multilocularis infection in mice modulates peritoneal CD4+ and CD8+ regulatory T cell development. Parasitol Int. 2011;60:45–53.

229. Li Z, Liu G, Chen Y, Liu Y, Liu B, Su Z. The phenotype and function of naturally existing regulatory dendritic cells in nematode-infected mice. Int J Parasitol. 2011;41:1129–37.

230. MacDonald AS, Straw AD, Dalton NM, Pearce EJ. Cutting Edge: Th2 Response Induction by Dendritic Cells: A Role for CD40. J Immunol. 2002;168:537–40.

231. Dowling DJ, Noone CM, Adams PN, Vukman K V., Molloy SF, Forde J, et al. Ascaris lumbricoides pseudocoelomic body fluid induces a partially activated dendritic cell phenotype with Th2 promoting ability in vivo. Int J Parasitol. 2011;41:255–61.

232. Casaravilla C, Pittini Á, Rückerl D, Seoane PI, Jenkins SJ, MacDonald AS, et al. Unconventional maturation of dendritic cells induced by particles from the laminated layer of larval Echinococcus granulosus. Infect Immun. 2014;82(8):3164–76.

233. Pittini Á, Martínez-Acosta YE, Casaravilla C, Seoane PI, Rückerl D, Quijano C, et al. Particles from the Echinococcus granulosus Laminated Layer Inhibit CD40 Upregulation in Dendritic Cells by Interfering with Akt Activation. Herbert DR, editor. Infect Immun. 2019;87(12).

234. Okwor I, Jia P, Uzonna JE. Interaction of Macrophage Antigen 1 and CD40 Ligand Leads to IL-12 Production and Resistance in CD40-Deficient Mice Infected with Leishmania major. J Immunol. 2015;195:3218–26.

235. Martin DL, King CL, Pearlman E, Strine E, Heinzel FP. IFN-γ Is Necessary But Not Sufficient for Anti-CD40 Antibody-Mediated Inhibition of the Th2 Response to Schistosoma mansoni Eggs. J Immunol. 2000;164:779–85.

236. Hellings PW, Kasran A, Bullens D, Overbergh L, Mathieu C, Heremans H, et al. IL-10- and IL-12-Independent Down-Regulation of Allergic Sensitization by Stimulation of CD40 Signaling. J Immunol. 2006;177:5138–44.

237. Jenkins SJ, Mountford AP. Dendritic cells activated with products released by schistosome larvae drive Th2-type immune responses, which can be inhibited by manipulation of CD40 costimulation. Infect Immun. 2005;73:395–402.

238. Jenkins SJ, Perona-Wright G, MacDonald AS. Full Development of Th2 Immunity Requires Both Innate and Adaptive Sources of CD154. J Immunol. 2008;180(12):8083–92.

239. Gärdby E, Chen XJ, Lycke NY. Impaired CD40-signalling in CD19-deficient mice selectively affects Th2-dependent isotype switching. Scand J Immunol. 2001;53:13–23.

240. Mehlhop PD, Van de Rijn M, Brewer JP, Kisselgof AB, Geha RS, Oettgen HC, et al. CD40L, but not CD40, is required for allergen-induced bronchial hyperresponsiveness in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000;23:646–51.

241. MacDonald AS, Patton EA, La Flamme AC, Araujo MI, Huxtable CR, Bauman B, et al. Impaired Th2 Development and Increased Mortality During Schistosoma mansoni Infection in the Absence of CD40/CD154 Interaction. J Immunol. 2002;168:4643–9.

242. Nierkens S, van Helden P, Bol M, Bleumink R, van Kooten P, Ramdien-Murli S, et al. Selective Requirement for CD40-CD154 in Drug-Induced Type 1 Versus Type 2 Responses to Trinitrophenyl-Ovalbumin. J Immunol. 2002;168:3747–54.

243. Rodríguez-Sosa M, Satoskar AR, David JR, Terrazas LI. Altered T helper responses in CD40 and interleukin-12 deficient mice reveal a critical role for Th1 responses in eliminating the helminth parasite Taenia crassiceps. Int J Parasitol. 2003;33:703–11.

244. Lu P, Urban JF, Zhou XD, Chen SJ, Madden K, Moorman M, et al. CD40-mediated stimulation contributes to lymphocyte proliferation, antibody production, eosinophilia, and mastocytosis during an in vivo type 2 response, but is not required for T cell IL-4 production. J Immunol. 1996;156:3327–33.

245. Laman JD, Claassen E, Noelle RJ. Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L). Crit Rev Immunol. 2017;37:371–420.

246. Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Immunol Rev. 2009;229(1):152–72.

247. Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. Cell Mol Life Sci. 2001;58(1):4–43.

248. Lee BO, Moyron-Quiroz J, Rangel-Moreno J, Kusser KL, Hartson L, Sprague F,

et al. CD40, but Not CD154, Expression on B Cells Is Necessary for Optimal Primary B Cell Responses. J Immunol. 2003;171:5707–17.

249. Khan WI, Motomura Y, Blennerhassett PA, Kanbayashi H, Varghese AK, El-Sharkawy RT, et al. Disruption of CD40-CD40 ligand pathway inhibits the development of intestinal muscle hypercontractility and protective immunity in nematode infection. Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol. 2005;288.

250. Tatsumi N, El-Fenej J, Davila-Pagan A, Kumamoto Y. CD301b+ dendritic cell-derived IL-2 dictates CD4+ T helper cell differentiation. Nat Commun. 2025;16.

251. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. Nature. 2000;408:57–63.

252. Ettinger R, Kuchen S, Lipsky PE. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. Immunol Rev. 2008;223(1):60–86.

253. Recher M, Berglund LJ, Avery DT, Cowan MJ, Gennery AR, Smart J, et al. IL-21 is the primary common γ chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo. Blood. 2011;118:6824–35.

254. Banchereau J, de Paoli P, Vallé A, Garcia E, Rousset F. Long-Term Human B Cell Lines Dependent on Interleukin-4 and antibody to CD40. Science (80-). 1991;251:70–2.

255. Clark EA, Shu GL, Lüscher B, Draves KE, Banchereau J, Ledbetter JA, et al. Activation of human B cells. Comparison of the signal transduced by IL-4 to four different competence signals. J Immunol. 1989;143:3873–80.

256. Blanchard D, Gaillard C, Hermann P, Banchereau J. Role of CD40 antigen and interleukin-2 in T cell-dependent human B lymphocyte growth. Eur J Immunol. 1994;24:330–5.

257. Hodgkin PD, Yamashita LC, Coffman RL, Kehry MR. Separation of events mediating B cell proliferation and Ig production by using T cell membranes and lymphokines. J Immunol. 1990;145:2025–34.

258. Noelle RJ, Daum J, Bartlett WC, McCann J, Shepherd DM. Cognate interactions between helper T cells and B cells. V. Reconstitution of T helper cell function using purified plasma membranes from activated Th1 and Th2 T helper cells and lymphokines. J Immunol. 1991;146:1118–24.

259. Zhang K, Clark EA, Saxon A. CD40 stimulation provides an IFN-gamma-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. J Immunol. 1991;146:1836–42.

260. Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D. CD40 and IgE: Synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. J Exp Med. 1990;172:1861–4.

261. Michel NA, Zirlik A, Wolf D. CD40L and Its Receptors in Atherothrombosis—An Update. Front Cardiovasc Med. 2017;4(40).

262. Liu PS, Chen YT, Li X, Hsueh PC, Tzeng SF, Chen H, et al. CD40 signal rewires fatty acid and glutamine metabolism for stimulating macrophage anti-tumorigenic functions. Nat Immunol. 2023;24:452–62.

263. Mathur RK, Awasthi A, Wadhone P, Ramanamurthy B, Saha B. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. Nat Med. 2004;10:540–4.

264. Mandl JN, Liou R, Klauschen F, Vrisekoop N, Monteiro JP, Yates AJ, et al. Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naïve CD4+ and CD8+ T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:18036–41.

265. This S, Rogers D, Mallet Gauthier È, Mandl JN, Melichar HJ. What's self got to do with it: Sources of heterogeneity among naive T cells. Semin Immunol. 2023;65:101702.

266. Wenger R, Kurtcuoglu V, Scholz C, Marti H, Hoogewijs D. Frequently asked questions in hypoxia research. Hypoxia. 2015;3:35.

267. Gow DJ, Sauter KA, Pridans C, Moffat L, Sehgal A, Stutchfield BM, et al. Characterisation of a novel fc conjugate of macrophage colony-stimulating factor. Mol Ther. 2014;22:1580–92.

268. Koller M. Robustlmm: An R package for Robust estimation of linear Mixed-Effects models. J Stat Softw. 2016;75.

269. Searle SR, Speed FM, Milliken GA. Population Marginal Means in the Linear Model: An Alternative to Least Squares Means. Am Stat. 1980;34(4):216.

270. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J R Stat Soc Ser B Stat Methodol. 1995;57:289–300.

271. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature. 1983;301:527–30.

272. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. Immunol Rev. 2000;174(1):21–34.

273. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:12053–8.

274. Zigmond E, Varol C, Farache J, Elmaliah E, Satpathy AT, Friedlander G, et al. Ly6Chi Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells. Immunity. 2012;37:1076–90.

275. Sutherland TE. Chitinase-like proteins as regulators of innate immunity and

tissue repair: helpful lessons for asthma? Biochem Soc Trans. 2018;46(1):141–51.

276. Xie J, Zhang J, Wu H, Tang X, Liu J, Cheng G, et al. The influences of age on T lymphocyte subsets in C57BL/6 mice. Saudi J Biol Sci. 2017;24:108–13.

277. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature. 1998;391(6667):591–4.

278. Vonderheide RH, Flaherty KT, Khalil M, Stumacher MS, Bajor DL, Hutnick NA, et al. Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody. J Clin Oncol. 2007;25:876–83.

279. Lim CY, Chang JH, Lee WS, Kim J, Park IY. CD40 Agonists Alter the Pancreatic Cancer Microenvironment by Shifting the Macrophage Phenotype toward M1 and Suppress Human Pancreatic Cancer in Organotypic Slice Cultures. Gut Liver. 2022;16:645–59.

280. Hochrein H, O'Keeffe M, Luft T, Vandenabeele S, Grumont RJ, Maraskovsky E, et al. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. J Exp Med. 2000;192:823–33.

281. Watanabe N, Hanabuchi S, Marloie-Provost MA, Antonenko S, Liu YJ, Soumelis V. Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. Blood. 2005;105:4749–51.

282. Ebner S, Ratzinger G, Krösbacher B, Schmuth M, Weiss A, Reider D, et al. Production of IL-12 by Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Is Optimal When the Stimulus Is Given at the Onset of Maturation, and Is Further Enhanced by IL-4. J Immunol. 2001;166:633–41.

283. Takenaka H, Maruo S, Yamamoto N, Wysocka M, Ono S, Kobayashi M, et al. Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. J Leukoc Biol. 1997;61:80–7.

284. Bullens DMA, Kasran A, Thielemans K, Bakkus M, Ceuppens JL. CD40L-induced IL-12 production is further enhanced by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. Scand J Immunol. 2001;53:455–63.

285. Kaliński P, Smits HH, Schuitemaker JHN, Vieira PL, van Eijk M, de Jong EC, et al. IL-4 Is a Mediator of IL-12p70 Induction by Human Th2 Cells: Reversal of Polarized Th2 Phenotype by Dendritic Cells. J Immunol. 2000;165:1877–81.

286. Möttönen M, Isomäki P, Luukkainen R, Lassila O. Regulation of CD154-induced interleukin-12 production in synovial fluid macrophages. Arthritis Res Ther. 2002;4(5):R9.

287. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of

cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: Priming for IL-12 and tumor necrosis factor α production. J Exp Med. 1995;181:537–46.

288. Wolf D, Bukosza N, Engel D, Poggi M, Jehle F, Michel NA, et al. Inflammation, but not recruitment, of adipose tissue macrophages requires signalling through Mac-1 (CD11B/CD18) in diet-induced obesity (DIO). Thromb Haemost. 2017;117:325–38.

289. Valledor AF, Arpa L, Sanchez-Tilló E, Comalada M, Casals C, Xaus J, et al. IFN-{gamma}-mediated inhibition of MAPK phosphatase expression results in prolonged MAPK activity in response to M-CSF and inhibition of proliferation. Blood. 2008;112:3274–82.

290. Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, Maino V, Davis K, Murphy K, et al. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. J Exp Med. 1995;182:1357–67.

291. Daw RH. Characterising the peritoneal and hepatic response to enteric nematode infection. The Univiersity of Manchester; 2021.

292. Araya RE, Goldszmid RS. Characterization of the tumor immune infiltrate by multiparametric flow cytometry and unbiased high-dimensional data analysis. In: Methods in Enzymology. Academic Press Inc.; 2020. p. 309–37.

293. Mylonas KJ, Nair MG, Prieto-Lafuente L, Paape D, Allen JE. Alternatively Activated Macrophages Elicited by Helminth Infection Can Be Reprogrammed to Enable Microbial Killing. J Immunol. 2009;182:3084–94.

294. Kang K, Park SH, Chen J, Qiao Y, Giannopoulou E, Berg K, et al. Interferon-γ Represses M2 Gene Expression in Human Macrophages by Disassembling Enhancers Bound by the Transcription Factor MAF. Immunity. 2017;47:235–50.

295. Accarias S, Genthon C, Rengel D, Boullier S, Foucras G, Tabouret G. Single-cell analysis reveals new subset markers of murine peritoneal macrophages and highlights macrophage dynamics upon Staphylococcus aureus peritonitis. Innate Immun. 2016;22:382–92.

296. Martin AT, Giri S, Safronova A, Eliseeva SI, Kwok SF, Yarovinsky F. Parasite-induced IFN-γ regulates host defense via CD115 and mTOR-dependent mechanism of tissue-resident macrophage death. PLoS Pathog. 2024;20.

297. Anthony RM, Urban JF, Alem F, Hamed HA, Rozo CT, Boucher J, et al. Memory T H 2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. 2006;12(8):955–60.

298. Hepworth MR, Daniłowicz-Luebert E, Rausch S, Metz M, Klotz C, Maurer M, et al. Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:6644–9.

299. Faas M, Ipseiz N, Ackermann J, Culemann S, Grüneboom A, Schröder F, et al. IL-33-induced metabolic reprogramming controls the differentiation of

alternatively activated macrophages and the resolution of inflammation. Immunity. 2021;54:2531-2546.e5.

300. Simbrunner B, Mandorfer M, Trauner M, Reiberger T. Gut-liver axis signaling in portal hypertension. World J Gastroenterol. 2019;25(39):5897–917.

301. Doherty DG. Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review. J Autoimmun. 2016;66:60–75.

302. You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. Hepatology. 2008;48:978–90.

303. Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. Cancer Res. 2010;70:99–108.

304. Boisvert J, Edmondson S, Krummel MF. Immunological Synapse Formation Licenses CD40-CD40L Accumulations at T-APC Contact Sites. J Immunol. 2004;173:3647–52.

305. White AL, Chan HTC, Roghanian A, French RR, Mockridge CI, Tutt AL, et al. Interaction with FcγRIIB Is Critical for the Agonistic Activity of Anti-CD40 Monoclonal Antibody. J Immunol. 2011;187:1754–63.

306. Li F, Ravetch J V. Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. Science (80-). 2011;333:1030–4.

307. Kawashima H, Fukuda M. Sulfated glycans control lymphocyte homing. Ann N Y Acad Sci. 2012;1253:112–21.

308. DeNucci CC, Mitchell JS, Shimizu Y. Integrin Function in T-Cell Homing to Lymphoid and Nonlymphoid Sites: Getting There and Staying There. Crit Rev Immunol. 2009;29(2):87–109.

309. Cose S, Brammer C, Khanna KM, Masopust D, Lefrançois L. Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. Eur J Immunol. 2006;36:1423–33.

310. Hofmann M, Brinkmann V, Zerwes HG. FTY720 preferentially depletes naive T cells from peripheral and lymphoid organs. Int Immunopharmacol. 2006;6(13–14):1902–10.

311. Harp JR, Onami TM. Naïve T Cells Re-Distribute to the Lungs of Selectin Ligand Deficient Mice. PLoS One. 2010;5(6):e10973.

312. Westermann J, Geismar U, Sponholz A, Bode U, Sparshott SM, Bell EB. CD4+ T cells of both the naive and the memory phenotype enter rat lymph nodes and Peyer's patches via high endothelial venules: Within the tissue their migratory behavior differs. Eur J Immunol. 1997;27:3174–81.

313. Westermann J, Ehlers E, Exton MS, Kaiser M, Bode U. Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune

responses. Immunol Rev. 2001;184(1):20–37.

314. Luettig B, Kaiser M, Bode U, Bell EB, Sparshott SM, Bette M, et al. Naive and memory T cells migrate in comparable numbers through the normal rat lung: Only effector T cells accumulate and proliferate in the lamina propria of the bronchi. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001;25:69–77.

315. Yoshihara T, Okabe Y. Aldh1a2 + fibroblastic reticular cells regulate lymphocyte recruitment in omental milky spots. J Exp Med. 2023;220(5).

316. Daley AD, Bénézech C. FRC-derived retinoic acid: The key to unlocking milky spots. J Exp Med. 2023;220(5).

317. Daley AD, Bénézech C. Fat-associated lymphoid clusters: Supporting visceral adipose tissue B cell function in immunity and metabolism. Immunol Rev. 2024;324(1):78–94.

318. Man L, Lewis E, Einbinder T, Rogachev B, Chaimovitz C, Douvdevani A. Major involvement of CD40 in the regulation of chemokine secretion from human peritoneal mesothelial cells. Kidney Int. 2003;64:2064–71.

319. Mazar J, Agur T, Rogachev B, Ziv NY, Zlotnik M, Chaimovitz C, et al. CD40 ligand (CD154) takes part in regulation of the transition to mononuclear cell dominance during peritonitis. Kidney Int. 2005;67:1340–9.

320. Kawabe T, Yi J, Sprent J. Homeostasis of Naive and Memory T Lymphocytes. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2021;13(9):a037879.

321. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. Immunity. 2008;29(6):848–62.

322. Thaiss CA, Semmling V, Franken L, Wagner H, Kurts C. Chemokines: A New Dendritic Cell Signal for T Cell Activation. Front Immunol. 2011;2:31.

323. Murphy TL, Murphy KM. Dendritic cells in cancer immunology. Cell Mol Immunol. 2022;19(1):3–13.

324. Dai Z, Lakkis FG. Cutting Edge: Secondary Lymphoid Organs Are Essential for Maintaining the CD4, But Not CD8, Naive T Cell Pool. J Immunol. 2001;167:6711–5.

325. Chen BD, Sensenbrenner L, Fan K, Run QY. Murine recombinant IL-4 is a bifunctional regulator of macrophage growth induced by colony-stimulating factors. J Immunol. 1992;148:753–9.

326. Bouquerel C, César W, Barthod L, Arrak S, Battistella A, Gropplero G, et al. Precise and fast control of the dissolved oxygen level for tumor-on-chip. Lab Chip. 2022;22:4443–55.

327. Alva R, Wiebe JE, Stuart JA. The effect of baseline O2 conditions on the response of prostate cancer cells to hypoxia. Am J Physiol - Cell Physiol. 2024;327:C97–112.

328. Pasqual G, Chudnovskiy A, Tas JMJ, Agudelo M, Schweitzer LD, Cui A, et al.

Monitoring T cell-dendritic cell interactions in vivo by intercellular enzymatic labelling. Nature. 2018;553(7689):496–500.

329. Finlay CM, Allen JE. The immune response of inbred laboratory mice to Litomosoides sigmodontis : A route to discovery in myeloid cell biology. Parasite Immunol. 2020 Jul 21;42(7):1–17.